



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Agrícola y Bromatología



**PRODUCCIÓN DE HIDROLIZADOS PROTEICOS CON
PROPIEDADES ANTIHIPERTENSIVAS MEDIANTE
PROTEÓLISIS Y ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS A
PARTIR DE LEGUMINOSAS**

MEMORIA PRESENTADA POR

PATRICIA GARCÍA MORA

PARA OPTAR AL GRADO DE

DOCTOR

DIRECTORAS DE TESIS

Dra. CRISTINA MARTÍNEZ VILLALUENGA

Dra. ELENA PEÑAS POZO

Dra. JUANA FRÍAS AREVALILLO

MADRID, 2016

Madrid, 12 enero de 2016

CRISTINA MARTÍNEZ VILLALUENGA, CIENTÍFICA TITULAR, ELENA PEÑAS POZO, INVESTIGADORA RAMÓN Y CAJAL, Y JUANA FRIAS AREVALILLO, INVESTIGADORA CIENTÍFICA DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS.

HACEN CONSTAR QUE:

El presente trabajo titulado **“Producción de hidrolizados proteicos con propiedades antihipertensivas mediante proteólisis y altas presiones hidrostáticas a partir de leguminosas”** ha sido realizado por Dña. Patricia García Mora bajo nuestra dirección en el Departamento de Caracterización, Calidad y Seguridad del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), constituyendo la Tesis Doctoral de su autora.

Dra. Cristina Martínez Villaluenga Dra. Elena Peñas Pozo Dra. Juana Frías Arevalillo

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la adjudicación de una ayuda de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Economía y Competitividad en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC).

El trabajo ha sido financiado por el proyecto de investigación AGL-2010-16310 titulado “Procesos tecnológicos para la obtención de extractos funcionales de leguminosas con actividad antihipertensiva” financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y el Ministerio de Economía y Competitividad (2010-2014).



FACULTAD DE
CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Visto Bueno: TUTORA

Dra. Yolanda Aguilera Gutiérrez

A mi madre y a mi estrellita...

Agradecimientos

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la adjudicación de una ayuda predoctoral en el marco de programa “Formación de personal Investigador (FPI)”. Agradezco los recursos técnicos y a todas las personas del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición y del Instituto de Química Orgánica Manuel Lora Tamayo que de alguna manera me han ayudado y facilitado mi estancia predoctoral.

De manera cronológica mis primeros agradecimientos van dirigidos a todo el equipo del CEBAS y en particular al Dr. Ángel Gil Izquierdo por darme la posibilidad de iniciar mi carrera en el mundo de la investigación.

Seguidamente quisiera agradecer de manera muy especial a mis directoras de Tesis, las Doctoras Juana Frías, Cristina Martínez y Elena Peñas por la ayuda brindada para seguir formándome a nivel profesional y por su paciencia y cariño depositado para poder llevar a cabo este trabajo, ya que sin su ayuda no habría sido posible. Ellas siempre han estado ahí para orientarme, enseñarme, aconsejarme y corregirme tanto a nivel profesional como personal; así que muchísimas gracias por estar día tras día, hacerme crecer y hacer de mí alguien mejor.

Gracias a la Doctora Yolanda Aguilera, por ser mi tutora académica y por ofrecerme siempre su ayuda y disponibilidad.

Gracias a los compañeros de laboratorio por hacer el día a día más llevadero (Patricio, Sara, José Antonio, Laura, Andreíta, Natalia, Cristian...)

Además, tengo que expresar mi más sincera gratitud a los profesores Henryk Zielinski y Mariusz K. Piskula del Instituto of Animal Reproduction and Food Research, Academia de Ciencias Polacas (Olsztyn, Polonia), por su aceptación y ayuda en la realización de una estancia de 4 meses en su laboratorio. Allí tuve la suerte de coincidir con fantásticas personas como Juan Antonio, Małgorzata y Tomasz entre otros, los cuales me han ayudado no solo a nivel profesional con el aprendizaje de nuevas técnicas analíticas sino también a nivel personal ya que han hecho que me sintiera una más del grupo y me han ayudado a conocer Polonia, su gente y sus costumbres.

Agradecer como no a todo el personal del Departamento de “Microbiología del ICTAN” por siempre haber estado allí ya sea para unos cálculos o para un café rápido. Gracias por ofrecerme vuestra ayuda y vuestros consejos (Rosario, Blanca, Inés, María, Natalia, Pepe, Laura y La Pura).

No puedo olvidarme de Mar y de Lourdes, las jefas de la biblioteca, gracias por esos ánimos diarios durante mi escritura y por facilitarme más de un “paper”.

Asimismo, agradecer a Charo, Mercedes y M^a Ángeles su colaboración e implicación en la síntesis de péptidos en fase sólida y estudios de docking molecular.

Muchísimas gracias a todas las personas que he conocido en el Instituto durante estos cuatro años ya que de una manera u otra han contribuido a que que esta Tesis sea posible. Mil gracias a Andrea, Paco, Patrick, José Luis, Jaime, Laura y M^a Jesús, entre muchos otros.

No pueden faltar los colegas de Murcia, Madrid, Italia y más allá. Gracias por hacerme reír, llorar y soñar...por vuestra ayuda en todos estos años... y, en especial, a Kekko por su comprensión, seguimiento y cariño, sei il piu grande!!!

En último lugar, pero no menos importante, agradezco a mi madre su ayuda incondicional, su insistencia y constancia que me han hecho llegar hasta aquí. Gracias por esa frase que después de todo comienza a tener sentido. “Patricia, las cosas no caen en saco vacío...”

Y como no gracias a mis hermanas por darme fuerza, confianza y cariño porque sin vosotras todo hubiera sido mucho más aburrido.

En definitiva, gracias a todos los que habéis contribuido a que esto sea posible.

Aportaciones científicas

Aportaciones científicas

La siguiente memoria ha dado lugar a las siguientes aportaciones:

Publicaciones Científicas incluidas en el Journal Citation Report

1. **García-Mora, P.**, Peñas, E., Frías, J., Martínez-Villaluenga, C. (2014). Savinase, the most suitable enzyme for releasing peptides from lentil (*Lens culinaris* var. Castellana) protein concentrates with multifunctional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 4166-4174.
2. **García-Mora, P.**, Peñas, E., Frías, J., Martínez-Villaluenga, C. (2015). High-pressure treatment during lentil proteolysis improves hydrolytic efficiency and the release of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 171: 224-232.
3. **García-Mora, P.**, Frías, J., Peñas, E., Zielinski, H., Giménez-Bastida, J. A., Wiczowski, W., Zielinska, D., Martínez-Villaluenga, C. (2015). Simultaneous release of peptides and phenolics with antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities from pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. pinto) proteins by subtilisins. *Journal of Functional Foods*, 18: 319-332.
4. **García-Mora, P.**, Peñas, E., Frías, J., Zieliński, H., Wiczowski, J. A., Zielinska, D., Martínez-Villaluenga, C. High pressure-assisted enzymatic release of peptides and phenolics increase angiotensin converting enzyme I inhibitory and antioxidant activities of pinto bean hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2ª revisión).
5. **García-Mora, P.**, Martín-Martínez, M., Bonache, M. G., González-Múniz, R., Peñas, E., Frías, J., Martínez-Villaluenga, C. Identification, functional gastrointestinal stability and molecular docking studies of lentil peptides with dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (enviado).

Presentación a congresos y resúmenes publicados

1. **García-Mora, P.**, Martínez-Villaluenga, C., Gómez, R., Frías, J. Production of lentil-based functional ingredients for cardiovascular health by high

Aportaciones científicas

pressure-assisted proteolysis. Euro Food Chem XVII, 2013, Estambul (Turquia).

2. **García-Mora, P.**, Frías, J., Peñas, E., Zielinski, H., Giménez-Bastida, J. A., Wiczowski, W., Zielinska, D., Martínez-Villaluenga, C. Release of bioactive peptides and phenolics from pinto bean proteins by alkaline serine proteases. Euro Food Chem XVIII, 2015, Madrid (España).
3. Martínez-Villaluenga, C., Peñas, E., Paucar-Menacho, L., Frías, J., **García-Mora, P.** Production of functional hydrolysates from kiwicha (*Amaranthus caudatus*) proteins using Savinase® 16 L. Euro Food Chem XVIII, 2015, Madrid (España).

Abreviaturas y acrónimos

Abreviaturas y acrónimos

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonato)
APH	Altas presiones hidrostáticas
AT1/AT2	Receptores de angiotensina II (1 y 2)
BAL	Bacterias ácido lácticas
COX-2	Ciclooxigenasa-2
DASH	Aproximaciones dietéticas para prevenir la hipertensión
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
ECA	Enzima convertidora de angiotensina I
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EFSA	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ET-1	Endotelina 1
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FRAP	Capacidad de atrapar el ión férrico
GAE	Equivalentes de ácido gálico
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IFN-γ	Interferón γ
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IL-1β	Interleuquina 1 β
IL-1	Interleuquina 1
IL-2	Interleuquina 2
IL-6	Interleuquina 6
IL-18	Interleuquina 18
ILSI	International Life Science Institute
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LPO	Lipooxigenasa
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NF-$\kappa\beta$	Factor de transcripción nuclear $\kappa\beta$
\cdotOH	Radicales hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Óxido nítrico
ONSe	Óxido nítrico sintasa endotelial
ONSi	Óxido nítrico sintasa inducible
OONO	Peroxinitrito
ORAC	Capacidad de atrapar radicales de oxígeno
O$_2$$\cdot^-$	Aniones superóxido
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
PAM	Presión arterial media

Abreviaturas y acrónimos

PCR	Proteína C reactiva
QSAR	Relación estructura-actividad cuantitativa
ROO⁻	Radical peroxilo
sECA	Enzima convertidora de angiotensina I somática
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
SSADH	Succinato semialdehído deshidrogenasa
STNFR	Receptores del factor del TNF- α
tECA	Enzima convertidora de angiotensina I testicular
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TNFR I/II	Receptores I y II del factor de necrosis tumoral
VC	Voltametría cíclica
VCAM-1	Molécula de citoadhesión vascular 1

Nomenclatura de los aminoácidos

Nomenclatura de los aminoácidos

A lo largo de esta memoria se ha utilizado la nomenclatura y simbolismos de aminoácidos recomendados por la Comisión de Nomenclatura de Bioquímica (JCBN) de la IUPAC-IUB (“Nomenclature and Symbolism for Aminoacids and Peptides”), *Pure and Applied Chemistry*. 1984, 56, 595-674; <http://www.chem.gmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/>)

Mientras no se indique lo contrario, los aminoácidos pertenecen a la serie natural L. En cuanto a los péptidos, el residuo que tiene grupo amino libre, o no acilado por otro aminoácido, se denomina N-terminal y el que tiene un grupo carboxilo libre se denomina C-terminal. Tanto para nombrarlos como para representarlos gráficamente, se comienza por el residuo N-terminal, seguido de los aminoácidos internos en orden, para finalizar con el residuo C-terminal.

Aminoácidos (Aa)	Código de 3 letras	Código de 1 letra
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Cisteína	Cys	C
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Tirosina	Tyr	Y
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	I
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Triptófano	Trp	W
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Histidina	His	H

Índice

Índice

1. Resumen	3
2. Interés y objetivos.....	9
3. Introducción	15
3.1 Hipertensión: importancia y prevalencia	15
3.2. Patogénesis y mecanismos implicados en la hipertensión.....	17
3.2.1. Sistema renina-angiotensina-aldosterona	17
3.2.2. Estrés oxidativo e inflamación	21
3.3. Prevención de la hipertensión.....	26
3.4. Las leguminosas en la prevención de las enfermedades cardiovasculares	29
3.5. Componentes de las leguminosas relevantes en el control de la presión sanguínea	34
3.5.1 Proteínas	34
3.5.2. Péptidos bioactivos.....	36
3.5.2.1. Péptidos antihipertensivos	36
3.5.2.2. Péptidos con actividad antioxidante	38
3.5.2.3. Péptidos con actividad anti-inflamatoria	40
3.5.3. Compuestos fenólicos	43
3.6. Hidrolizados proteicos.....	45
3.6.1. Características generales y aplicaciones	45
3.6.2. Estrategias tecnológicas para la producción de hidrolizados proteicos.	46
3.6.2.1. Hidrólisis enzimática.....	47
3.6.2.2. Fermentación.....	49
3.6.2.3. Combinación de fermentación e hidrólisis enzimática	50
3.6.2.4. Procesos post-hidrolíticos	51

3.6.3. Aplicación de altas presiones hidrostáticas para la producción de péptidos bioactivos	52
4. Resultados.....	57
4.1. Producción de hidrolizados multifuncionales a partir de leguminosas mediante hidrólisis con proteasas de grado alimentario.....	57
4.2. Producción de hidrolizados multifuncionales a partir de leguminosas mediante hidrólisis enzimática asistida por altas presiones hidrostáticas. ...	119
5. Discusión general	177
5.1. Producción de hidrolizados proteicos multifuncionales a partir de lenteja castellana mediante hidrólisis con proteasas de grado alimentario.....	178
5.2. Producción de hidrolizados proteicos multifuncionales a partir de judía pinta mediante hidrólisis con proteasas de grado alimentario.	190
5.3. Producción de hidrolizados proteicos multifuncionales a partir de lenteja castellana mediante hidrólisis enzimática asistida por APH.	199
5.4. Producción de hidrolizados proteicos multifuncionales a partir de judía pinta mediante hidrólisis enzimática asistida por APH.	206
6. Conclusiones	221
7. Bibliografía.....	225

Resumen

1. Resumen

La presente Tesis Doctoral pretende obtener e identificar péptidos bioactivos y compuestos fenólicos mediante hidrólisis enzimática a presión atmosférica o asistida por altas presiones hidrostáticas de concentrados proteicos de lenteja castellana (*Lens culinaris* L. var. castellana) y judía pinta (*Phaseolus vulgaris* var. pinto) para su incorporación como ingredientes multifuncionales en alimentos antihipertensivos.

La hidrólisis enzimática se realizó empleando 4 proteasas de grado alimentario (Alcalasa, Savinasa, Corolasa 7089 y Protamex) a tiempos de hidrólisis comprendidos entre 0 y 180 min a presión atmosférica con el fin de conocer la influencia de las condiciones de hidrólisis en el rendimiento proteolítico de las enzimas empleadas, así como en la liberación de péptidos bioactivos y compuestos fenólicos con actividades inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) y antioxidante a partir de concentrados proteicos de lenteja. Los resultados obtenidos revelaron que tanto el tipo de proteasa como el tiempo de reacción tuvieron gran influencia en las propiedades funcionales de los hidrolizados proteicos obtenidos a partir de lenteja. Alcalasa y Savinasa fueron las enzimas más efectivas en la producción de hidrolizados proteicos con actividades inhibidora de la ECA y antioxidante de lenteja, siendo los hidrolizados producidos con Savinasa durante 120 min a 40 °C los que presentaron mejores propiedades bioactivas. En general, los digeridos gastrointestinales mostraron mayores actividades biológicas que los hidrolizados proteicos sin digerir.

Posteriormente, se realizó la identificación de péptidos con propiedades antioxidantes e inhibidoras de la ECA en los hidrolizados proteicos de lenteja más activos mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Varios fragmentos de la vicilina, convicilina y legumina mostraron actividad antioxidante e inhibidora de la ECA, destacando el péptido NSLTLPILRYL por su alta capacidad antioxidante e inhibidora de la ECA. La actividad biológica de los péptidos derivados de lenteja se relacionó positivamente con las propiedades estéricas e hidrofóbicas de los residuos de

aminoácidos de la región C-terminal. Adicionalmente, estudios de docking demostraron que los péptidos que ejercían una inhibición de la ECA más potente formaban un gran número de interacciones no covalentes con los residuos del centro activo de la enzima. Por último, se observó que la potencia de los péptidos derivados de lenteja aumenta considerablemente tras la simulación de un proceso de digestión gastrointestinal en condiciones fisiológicas.

En segundo lugar, se obtuvieron hidrolizados proteicos de judía ricos en péptidos bioactivos y compuestos fenólicos con actividades inhibidora de la ECA, antioxidante y anti-inflamatoria mediante hidrólisis enzimática con las enzimas Alcalasa y Savinasa. Los hidrolizados obtenidos con Savinasa durante 90 min y los producidos con Alcalasa durante 120 min fueron los que presentaron mayores bioactividades, si bien los primeros presentaron una mayor concentración de compuestos fenólicos y los segundos un mayor contenido de péptidos de bajo peso molecular (< 3 kDa) y mayor actividad anti-inflamatoria.

Finalmente, se ha estudiado el efecto de la aplicación de altas presiones hidrostáticas (APH) durante el proceso de hidrólisis enzimática en la producción de hidrolizados proteicos ricos en péptidos bioactivos y compuestos fenólicos con actividades inhibidora de la ECA y antioxidante a partir de lenteja y judía. Las APH mejoraron la eficiencia proteolítica de las cuatro proteasas estudiadas sobre las proteínas de lenteja, así como las actividades inhibidora de la ECA y antioxidante de los hidrolizados producidos. La hidrólisis con Savinasa a 300 MPa durante 15 min dio lugar a los hidrolizados de lenteja con mayores actividades biológicas, que se mantuvieron o incluso mejoraron tras ser sometidos a una digestión gastrointestinal *in vitro*. La aplicación de esta tecnología emergente también fue eficaz para la producción de hidrolizados proteicos de judía, ya que favoreció la liberación de péptidos de bajo peso molecular así como de compuestos fenólicos, siendo el tratamiento con Savinasa a 200 MPa durante 15 min el más efectivo para maximizar las actividades inhibidora de la ECA y antioxidante de los hidrolizados de judía.

En conjunto, estos estudios confirman que el tratamiento de hidrólisis enzimática, especialmente si es asistida por APH, es una herramienta efectiva

para producir hidrolizados multifuncionales con actividades inhibidora de la ECA, antioxidante y anti-inflamatoria a partir de proteínas de judía y lenteja. Estos hidrolizados podrían ser potencialmente empleados como ingredientes en la elaboración de alimentos funcionales dirigidos a la regulación de la presión sanguínea.

Interés y objetivos

2. Interés y objetivos

La hipertensión arterial es uno de los problemas más importantes de salud pública a nivel mundial, debido a su elevada prevalencia y alto índice de mortalidad, así como al deterioro de la calidad de vida de las personas afectadas. Esta patología afecta aproximadamente a un tercio de la población adulta global y es uno de los factores de riesgo cardiovascular más prevalentes en los países occidentales, por lo que supone una importante carga económica para el sistema sanitario público.

Aunque el avance en la terapia farmacológica ha sido muy llamativo en los últimos años, en algunos casos el control de los valores de presión arterial es muy difícil, por lo que la instauración de medidas no farmacológicas alternativas es fundamental y debe acompañar siempre al tratamiento farmacológico. La dieta juega un papel crucial en el control de la hipertensión, de modo que la adopción de hábitos dietéticos saludables es clave para prevenir y controlar esta patología. Sin embargo, por un lado, los hábitos nutricionales de la población se alejan cada vez más de los patrones dietéticos saludables y, por otro lado, la modificación de los hábitos diarios es de difícil cumplimiento para la mayoría de los individuos hipertensos. Estos hechos están impulsando la investigación y el desarrollo de ingredientes y alimentos funcionales encaminados a reducir la presión sanguínea, dirigidos a suplementar la dieta habitual sin implicar modificaciones drásticas de los hábitos nutricionales. En la actualidad, existe una escasa diversidad de alimentos antihipertensivos en el mercado, encontrándose disponibles únicamente productos lácteos fermentados. Las leguminosas constituyen una materia prima muy valiosa para el desarrollo de ingredientes/alimentos con propiedades saludables para el sistema cardiovascular, por ser una fuente nutritiva, económica y sostenible de proteínas que contienen encriptados diversos péptidos bioactivos y presentan, además, compuestos fenólicos a los que se les atribuyen propiedades beneficiosas en la regulación de la presión arterial. Por ello, el desarrollo de ingredientes con propiedades antihipertensivas a partir de leguminosas es de gran interés no sólo científico sino también para el sector industrial, ya que

permitirá la revalorización de dos leguminosas de escasa explotación en el campo de los alimentos funcionales y cuyo consumo está decayendo en los últimos años. La hidrólisis enzimática constituye una herramienta tecnológica muy útil en la producción de ingredientes funcionales al permitir la liberación de péptidos bioactivos encriptados en las proteínas alimentarias. El empleo de enzimas que contengan no sólo actividad proteasa sino también esterasa se presenta como una estrategia científica y tecnológica para potenciar el enriquecimiento de los hidrolizados proteicos en compuestos fenólicos, aumentando su funcionalidad. En este contexto, las APH se proponen como una tecnología novedosa para aumentar la actividad enzimática y, consecuentemente, el rendimiento hidrolítico, con lo que se consigue fomentar la funcionalidad de los hidrolizados, ya que aumenta la susceptibilidad proteica a la hidrólisis e induce la ruptura de las interacciones proteína-compuesto fenólico.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, la **hipótesis de partida** del presente trabajo es que los tratamientos de hidrólisis enzimática a presión atmosférica o en combinación con APH pueden ser efectivos para producir hidrolizados proteicos multifuncionales como ingredientes en el desarrollo de alimentos con propiedades antihipertensivas.

A partir de esta hipótesis, el **objetivo general** de la presente Tesis Doctoral fue el desarrollo de ingredientes multifuncionales a partir de lenteja castellana (*Lens culinaris* L. var. castellana) y judía pinta (*Phaseolus vulgaris* var. pinto) mediante hidrólisis enzimática con proteasas de grado alimentario a presión atmosférica o en combinación con altas presiones hidrostáticas.

Para alcanzar el objetivo general, se propusieron los siguientes **objetivos parciales**:

1. Optimizar las condiciones de hidrólisis enzimática (tipo de enzima y tiempo de reacción) para maximizar el grado de hidrólisis de las proteínas de lenteja castellana, así como las actividades antioxidante e inhibidora de la ECA de los hidrolizados producidos.

2. Identificar los péptidos derivados de proteínas de lenteja con actividades antioxidante e inhibidora de la ECA, estudio de la relación estructura-actividad y estabilidad a la digestión gastrointestinal.
3. Evaluar el impacto de las condiciones de hidrólisis enzimática (tipo de enzima y tiempo de reacción) sobre la liberación de péptidos bioactivos y compuestos fenólicos a partir de concentrados proteicos de judía pinta, así como sobre las actividades antioxidante, inhibidora de la ECA y anti-inflamatoria de los hidrolizados producidos.
4. Estudiar el efecto de las altas presiones hidrostáticas aplicadas durante el proceso de hidrólisis enzimática sobre el rendimiento proteolítico y la liberación de péptidos con actividades antioxidante e inhibidora de la ECA a partir de concentrados proteicos de lenteja castellana.
5. Estudiar la influencia de las altas presiones hidrostáticas aplicadas durante el proceso de hidrólisis enzimática sobre la eficiencia hidrolítica de subtilisinas comerciales para liberar péptidos bioactivos y compuestos fenólicos a partir de concentrados proteicos de judía pinta, así como sobre las actividades antioxidante e inhibidora de la ECA de los hidrolizados producidos.

Introducción

3. Introducción

3.1 Hipertensión: importancia y prevalencia

La hipertensión se caracteriza por un incremento crónico de la presión de la sangre proveniente del corazón contra las paredes de los vasos sanguíneos. La presión arterial tiene dos componentes: presión arterial sistólica (PAS) que corresponde al valor máximo de la tensión arterial en sístole (cuando el corazón se contrae) y presión arterial diastólica (PAD) que corresponde al valor mínimo de la tensión arterial cuando el corazón está en diástole (entre latidos cardíacos). La hipertensión se caracteriza por una PAS igual o superior a 140 mm Hg y una PAD igual o superior a 90 mm Hg. La hipertensión arterial se puede clasificar en varias categorías (Tabla 1), que tienen distinto pronóstico y tratamiento.

Tabla 1. Valores de presión arterial en adultos según el Sociedad Europea de Hipertensión Arterial (2013)

Categorías	PAS (mm Hg)	PAD (mm Hg)
Óptima	<120	<80
Normal	120-129	80-84
Normal alta	130-139	85-89
Hipertensión grado 1	140-159	90-99
Hipertensión grado 2	160-179	100-109
Hipertensión grado 3	≥180	≥110
Hipertensión sistólica aislada	≥140	<90

PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica

Según su causa, la hipertensión se puede clasificar en hipertensión primaria o esencial e hipertensión secundaria. La hipertensión primaria es responsable del 90-95% de los casos diagnosticados siendo los factores genéticos, socioeconómicos y conductuales claves en su desarrollo (Oparil y col., 2003).

La hipertensión secundaria solamente afecta al 5-10% de los pacientes hipertensos y, aunque en ocasiones tiene una base genética, en la mayoría de los casos se produce como consecuencia de la existencia de factores metabólicos como diabetes, hipercolesterolemia, sobrepeso y obesidad.

La hipertensión es un importante problema de salud pública a nivel mundial dada su elevada prevalencia, índice de mortalidad y a que es responsable de la discapacidad prematura de los individuos afectados. La prevalencia de la hipertensión está asociada al aumento y envejecimiento de la población y a factores conductuales como una dieta poco equilibrada, consumo de sal, inactividad física, consumo excesivo de alcohol, sobrepeso o exposición prolongada al estrés (Oparil y col., 2003). Se trata de una enfermedad que afecta a más del 20% de los adultos entre 40 y 65 años y casi al 50% en las personas de más de 65 años. El número de personas afectadas de hipertensión aumenta con los años y además, su aparición es cada vez más precoz, de modo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en 2008 que el 40% de los pacientes hipertensos eran mayores de 25 años. Como consecuencia de la hipertensión arterial, muchos órganos diana como el corazón, el cerebro y los riñones sufren daños ocasionando el desarrollo de enfermedades cardíacas, enfermedades cerebrovasculares, fallos renales, arterioesclerosis y retinopatías (Rubattu y col., 2015). La hipertensión duplica el riesgo de padecer enfermedades coronarias y triplica el riesgo de padecer accidentes cardiovasculares e insuficiencia cardíaca por lo que es un importante factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV). De hecho, las ECV son responsables de 17 millones de muertes al año, casi un tercio del total de muertes producidas a nivel mundial (Brown y col., 2009). La hipertensión causa el 45% de las muertes por cardiopatías y el 51% de las muertes por accidentes cardiovasculares. Además, la OMS estima que para el 2030 más de 23 millones de personas morirán a causa de ECV, lo que supone un alto coste para el sistema sanitario público. El coste global atribuido a las ECV, según las estadísticas europeas, fue de 196 billones de euros en el 2009, lo que supuso un 54% de los costes sanitarios directos (Nichols, 2012). Estas cifras ponen de relieve que las ECV representan la mayor carga

económica sanitaria en la mayoría de países de la Unión Europea y se prevé que si no se toman medidas para combatir la hipertensión, las pérdidas económicas sobrepasarán el gasto público en salud.

Con el objetivo de frenar este importante problema de salud pública y reducir los gastos económicos generados, los países deben disponer de sistemas y servicios para promover la cobertura sanitaria universal y apoyar modos de vida saludables que ayuden a prevenir y controlar la incidencia de la hipertensión. Esto implica una tarea de colaboración de múltiples organismos interesados como gobiernos, administraciones públicas, sociedad civil, industrias de alimentos y bebidas e instituciones académicas que ayuden a concienciar a la población de dicho problema. Los países de ingresos elevados han comenzado a reducir la hipertensión en sus poblaciones mediante políticas enérgicas de salud pública, como la reducción de la sal en los alimentos procesados y la amplia disponibilidad de servicios de diagnóstico y tratamiento de la hipertensión y otros factores de riesgo. En cambio, en muchos países en desarrollo el número de personas que sufren infartos de miocardio y accidentes cerebrovasculares provocados por factores de riesgo como la hipertensión aumenta cada año.

3.2. Patogénesis y mecanismos implicados en la hipertensión

3.2.1. Sistema renina-angiotensina-aldosterona

La regulación de la presión sanguínea es un proceso complejo dependiente de los sistemas vascular, renal, neuronal y endocrino (Hall y col., 2012). Uno de los sistemas mejor conocidos implicados en la regulación de la presión sanguínea es el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Se trata de un sistema hormonal que ayuda a regular el volumen extracelular corporal y la presión sanguínea pero, en ocasiones, la desregulación de este sistema o su persistente activación puede provocar un aumento crónico de la presión sanguínea y daños de órganos diana (Crowley y Coffman, 2012).

Aunque la renina por sí sola no produce la elevación de la presión sanguínea, es capaz de iniciar la cascada enzimática por la que se produce un potente péptido vasoconstrictor denominado angiotensina II.

La renina es una aspartil proteasa sintetizada en las células yuxttaglomerulares del riñón que es liberada al torrente sanguíneo cuando se produce un aumento de la osmolaridad del plasma o una disminución del flujo sanguíneo en el riñón (Crowley y Coffman, 2012). La renina cataliza la hidrólisis del enlace Leu10-Val11 del angiotensinógeno (Sielecki y col., 1989), una glucoproteína sintetizada en el hígado, produciendo angiotensina I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu). Este decapeptido biológicamente inactivo, es hidrolizado por el enlace peptídico Phe-His del extremo C-terminal por la enzima convertidora de angiotensina I (ECA), produciendo angiotensina II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), un potente péptido vasoconstrictor. La ECA, además, hidroliza la bradiquinina, péptido que presenta un potente efecto hipotensor, a péptidos inactivos (Riordan, 2003; Pacurari y col., 2014).

Paralelamente, la ECA estimula la activación de la aldosterona, una enzima segregada por la glándula suprarrenal que produce la reabsorción de sodio en las células de los túbulos distales y de los túbulos colectores corticales, induciendo la secreción de potasio y la reabsorción de sodio produciendo, consecuentemente, un aumento de la presión sanguínea (Hall y col., 2012). Se ha demostrado que los pacientes hipertensos presentan niveles más elevados de aldosterona en orina que los normotensos (Venning, 1961).

La angiotensina II ejerce su función fisiológica a través de su unión a dos subclases de receptores específicos de membrana (AT1 y AT2) (Peters, 1995). El receptor AT1 media la mayoría de acciones de la angiotensina II, entre las que destacan la vasoconstricción, la activación de la proliferación celular y la liberación de aldosterona y vasopresión produciendo, consecuentemente, la activación del sistema nervioso simpático (Banday y Lokhandwala, 2008). Estos receptores se localizan en el sistema nervioso central, en el corazón, en los riñones, en la musculatura periférica y en las glándulas adrenales (Dickson y Sigmund, 2006).

En lo que respecta al receptor AT2, se encuentra codificado en el cromosoma X y se expresa de manera predominante durante la etapa fetal. Por el contrario, en la etapa adulta, la expresión de este receptor es mínima y solo se

incrementa ante situaciones de estrés y daño tisular (Carey y Padia, 2008). Fisiológicamente, los efectos del receptor AT2 son contrarios a los del receptor AT1, es decir, inhiben la proliferación celular, promueven la apoptosis, producen vasodilatación e intervienen en el desarrollo fetal y en la diferenciación tisular (Oparil y col., 2003).

La ECA, enzima que produce la liberación de angiotensina II, es una metalopeptidasa dependiente de zinc y cloruro que se expresa en el organismo humano en dos isoformas: somática y testicular. Ambas isoformas son proteínas de membrana tipo 1 (Brew, 2003) cuyos centros activos están dirigidos hacia el exterior de las células, y en ellos hay sitios de unión para el catión zinc y el anión cloruro (Peters, 1995). La ECA somática (sECA) está compuesta por 1277 aminoácidos y presenta un peso molecular de 150-180 kDa. Esta isoforma está constituida por dos dominios homólogos, N-terminal y C-terminal, que contienen un ion zinc unido a la secuencia HExxH (His-Glu-X-X-His-His) de la enzima. Este catión está coordinado con el aminoácido Glu-411 de la hélice 14 y con los aminoácidos His383 y con el His387 de la hélice 13. En su extremo C-terminal posee 17 aminoácidos hidrofóbicos por los que se une a la membrana. Aunque ambos dominios tienen actividad proteasa, el dominio C-terminal es el más influyente en la regulación de la presión sanguínea (Cotton y col., 2002). La sECA ha sido localizada en la superficie de las células endoteliales del intestino y del pulmón y en las células tubulares del epitelio del riñón (Rosivall, 2009).

La ECA testicular o germinativa (tECA), situada en los testículos, únicamente contiene un dominio metaloproteinasa C-terminal junto con el dominio de anclaje a membrana hidrófoba y una pequeña región N-terminal que tiene múltiples oligosacáridos ligados (Ehlers y col., 1989). Al igual que en el caso de la sECA, el centro activo de la tECA contiene el ion Zinc^{2+} unido a la secuencia HExxH. La tECA tiene estructura helicoidal ya que está formada por 27 hélices (20 α -hélices y 7 3_{10} hélices) y presenta un peso molecular de 90-100 kDa (Brew, 2003).

Estas dos isoformas de ECA humana se encuentran codificadas por un único gen localizado en la región q23 del cromosoma 17 (Riordan, 2003).

Por otra parte, en las células del endotelio vascular, en el corazón y riñones se ha identificado una enzima homóloga a la ECA, conocida como ECA2 (Crackower y col., 2002). Se trata de una monocarboxil peptidasa que presenta afinidad por la angiotensina I, angiotensina II y bradiquinina (Gurley y Coffman, 2008). La ECA2 cataliza la hidrólisis de angiotensina II por su extremo C-terminal, dando lugar a la formación del péptido angiotensina 1-7 que es biológicamente activo y produce un incremento de la concentración de óxido nítrico y bradiquinina y de la síntesis de prostaglandinas, por lo que es capaz de reducir la presión sanguínea (Rosivall, 2009). Diferentes estudios en ratas hipertensas sugieren que la disminución de los niveles de ECA2 origina graves problemas de la contractilidad cardíaca, y aumento de la angiotensina II, por lo que se considera una enzima crucial en la regulación de las funciones cardíacas (Crackower y col., 2002).

Debido al importante papel que juega la ECA en la regulación de la presión sanguínea, el empleo de inhibidores de esta enzima es una estrategia valiosa para prevenir y controlar la hipertensión (Pacurari y col., 2014). Los inhibidores sintéticos se unen al centro activo de la enzima evitando así la unión del sustrato. Técnicas de difracción circular han demostrado que el mecanismo por el que los péptidos inhiben la ECA está relacionado con la reducción de las láminas- β y hélices- α que conforman la estructura secundaria de la enzima (He y col., 2014). La inhibición de la ECA provoca el bloqueo de la hidrólisis de angiotensina I a angiotensina II y el aumento de la biodisponibilidad de la bradiquinina (Tousoulis y col., 2012).

Actualmente, existen en el mercado una amplia variedad de fármacos sintéticos que ejercen su acción interactuando con el grupo zinc que la ECA contiene en su centro activo. Los más usados hasta el momento son: Benazepril, Captopril, Enalapril, Fosinopril, Lisinopril, Moexipril, Perindopril, Quinapril, Ramipril y Trandolapril (Sweitzer, 2003). A pesar de su eficacia en la reducción de la presión sanguínea, estos fármacos pueden provocar reacciones adversas en

algunos pacientes. El efecto secundario más común de dichos fármacos es la tos seca, que afecta aproximadamente a un 15% de los pacientes tratados. La hinchazón causada por una pequeña fuga de sangre en los vasos sanguíneos es otro de los posibles efectos adversos que ocurre en 0,1-0,5% de los casos (Riordan, 2003). Además, se ha comprobado que en pacientes con colesterol o que presentan diabetes, el tratamiento con inhibidores de la ECA puede ocasionar disfunción renal (Sweitzer, 2003). Por otra parte, este tipo de fármacos está contraindicado durante el segundo y el tercer mes de embarazo debido a que puede originar fetopatías como retraso del crecimiento, displasia renal, anuria e incluso la muerte (Cooper y col., 2006).

Una alternativa al consumo de fármacos que puede ayudar a prevenir la hipertensión son los péptidos bioactivos con actividad inhibidora de la ECA ya que tienen una baja incidencia de efectos adversos. Estos péptidos bioactivos se obtienen mediante tratamientos enzimáticos de proteínas alimentarias y pueden ser introducidos en la dieta como ingredientes en alimentos funcionales.

3.2.2. Estrés oxidativo e inflamación

Numerosas evidencias científicas indican que el estrés oxidativo y la inflamación juegan un papel crucial en la iniciación, progresión y desarrollo de la hipertensión (Montecucco y col., 2011; Araujo y Wilcox, 2014; Crowley, 2014; Pacurari y col., 2014). Ambos fenómenos están estrechamente relacionados entre sí y actúan de manera sinérgica a nivel del endotelio vascular y del riñón, contribuyendo a la fisiopatología de la hipertensión.

El estrés oxidativo se definió por primera vez en 1985 como un estado de desequilibrio en el organismo entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y los mecanismos de defensa antioxidantes, de modo que se produce un aumento de la concentración de ERO que provoca daños a nivel tisular (Sies, 1997). En condiciones fisiológicas se generan ERO en la mitocondria debido al metabolismo celular. Entre las ERO más importantes cabe destacar los aniones superóxido (O_2^-), los radicales hidroxilo ($\cdot OH$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que son necesarios para mantener una correcta

homeostasis y regular procesos celulares como el ciclo celular, la diferenciación, la proliferación y apoptosis celular y la expresión genética (Uttara y col., 2009). El organismo dispone de un sistema enzimático antioxidante que regula de manera natural la oxidación generada durante los procesos redox celulares, siendo la superóxido dismutasa, la peroxidasa y la catalasa algunas de las enzimas responsables. En condiciones de estrés oxidativo se produce una formación incontrolada de ERO o bien una inhibición del sistema enzimático antioxidante que resulta en el daño oxidativo de lípidos, proteínas, enzimas y ADN, fenómenos que han sido relacionados con el envejecimiento y con el desarrollo de diversas enfermedades, como el cáncer y la hipertensión (Fang y col., 2002).

El estrés oxidativo está implicado en la patogénesis de la hipertensión a través de diversos mecanismos:

a) La producción excesiva de ERO produce una disfunción del endotelio vascular ya que disminuye la producción y biodisponibilidad del óxido nítrico (ON) endotelial. El ON, producido por la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (ONSe), es una molécula vasodilatadora que produce la relajación del músculo liso endotelial y, consecuentemente, la vasodilatación, favoreciendo el aumento del flujo sanguíneo y la disminución de la presión sanguínea (Huang y col., 2013). En situaciones de estrés oxidativo, las ERO reaccionan con el ON endotelial formándose peroxinitrito (OONO^-). Los peroxinitritos son moléculas con potente actividad oxidante responsables de la oxidación del ácido araquidónico y de la liberación de isoprostanos con actividad vasoconstrictora. Los peroxinitritos, además, oxidan la tetrahidrobiopterina, cofactor de la ONSe, disminuyendo así la síntesis de ON y aumentando la producción de O_2^- por esta enzima (fenómeno que se conoce como desacoplamiento de la ONSe) (Harvey y col., 2015). La disminución de la disponibilidad de ON provoca la vasoconstricción endotelial y, consecuentemente, un aumento de la presión sanguínea. En el riñón, los niveles elevados de ERO producen una disminución de la concentración de ON que resulta en la reabsorción de agua y sodio, contribuyendo así a la hipertensión (Crowley, 2014).

b) Niveles elevados de ERO causan, además, una activación excesiva del sistema nervioso simpático que conduce a la liberación de renina por el riñón y, consecuentemente, al aumento de la presión sanguínea (Harrison y col., 2011; Dinh y col., 2014).

c) El estrés oxidativo desencadena, por otra parte, la transcripción de genes implicados en rutas de señalización intracelulares relacionadas con fenómenos inflamatorios. Así por ejemplo, niveles elevados de ERO en el citoplasma de las células endoteliales facilita la translocación del factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) al núcleo, donde activa la transcripción de una amplia variedad de moléculas proinflamatorias.

d) Además, el estrés oxidativo provoca fenómenos inflamatorios locales al aumentar la permeabilidad del endotelio vascular por el incremento de la expresión de moléculas de adhesión (molécula de citoadhesión vascular-1, VCAM-1 y molécula de adhesión intercelular-1, ICAM-1) permitiendo así la infiltración de células del sistema inmunitario. Principalmente, se produce una infiltración de macrófagos, que producen una remodelación arterial (disminución del diámetro del lumen arterial) (Bakker y col., 2008; Crowley, 2014) y linfocitos T, que producen citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleuquinas 1 y 2 (IL-1 e IL-2) e interferón γ (IFN- γ). El TNF- α induce, a su vez, la expresión de nuevas interleuquinas (IL-6) y moléculas de adhesión celular que atraen nuevas células del sistema inmune (Pacurari y col., 2014). La IL-1, por su parte, estimula la producción de NF- $\kappa\beta$ y otros mediadores proinflamatorios (Bakker y col., 2008). Los macrófagos que penetran en el endotelio vascular, a su vez, fagocitan lipoproteínas de baja densidad (LDL), facilitando su acumulación en la pared arterial y ocasionan la formación de la placa de ateroma. Todos estos eventos inflamatorios producen daños del endotelio vascular que causan una disfunción del mismo (Touyz, 2004). La disfunción del endotelio vascular provoca la disminución de la biodisponibilidad de ON y, por tanto, contribuye a la patogénesis de la hipertensión (Savoia y col., 2011). Las células endoteliales dañadas producen proteína C-reactiva, que causa también la disminución de la biodisponibilidad

de ON (Harrison y col., 2011), induce la activación de monocitos, desencadena fenómenos protrombóticos y promueve la liberación de endotelina 1 (ET-1), potente vasoconstrictor (Pauletto y Rattazzi, 2006; Schillaci y Pirro, 2006)

e) Las ERO en altas concentraciones producen también una lesión del tejido renal, que constituye un factor crucial en el desarrollo de la hipertensión. En respuesta a la lesión renal, se produce un reclutamiento e infiltración de macrófagos y células T dentro del parénquima renal, con la consecuente producción de mediadores proinflamatorios (Alvarez y col., 2002), que contribuyen a potenciar el daño renal (Olivieri y col., 1998) y, por tanto, aumentan la severidad de la hipertensión (Montecucco y col., 2011).

La cascada de fenómenos inflamatorios producida como consecuencia del estrés oxidativo también contribuye a la patogénesis de la hipertensión, ya que causa la producción de nuevas ERO, contribuyendo así a potenciar esta patología. En este sentido, las células del sistema inmune que se infiltran en el parénquima renal y en el endotelio vascular expresan la enzima NADPH oxidasa, responsable de la síntesis de nuevas ERO (Jackson y col., 2004; Drummond y col., 2011). Así mismo, los mediadores proinflamatorios producidos por las células del sistema inmune, generan nuevas ERO. El TNF- α , por ejemplo, provoca la producción de radicales O_2^- que disminuyen la vasodilatación endotelial mediada por ON (Gao y col., 2007), potenciando el incremento de presión arterial. Así mismo, la sobreexpresión de ET-1 causada por el estrés oxidativo, induce la activación de la NADPH oxidasa y, consecuentemente, incrementa la formación de ERO en el endotelio vascular (Siti y col., 2015), contribuyendo así al desarrollo de la hipertensión.

Es importante señalar que en individuos hipertensos, la producción excesiva de angiotensina II desempeña un papel clave en la progresión de la hipertensión, ya que promueve fenómenos inflamatorios y estrés oxidativo. Así, se ha demostrado que la angiotensina II induce la proliferación de células inmunitarias y la producción de citoquinas, moléculas quimiotácticas y de adhesión celular (Lemarie y Schiffrin, 2010; Pacurari y col., 2014) que atraen nuevas células proinflamatorias al endotelio vascular y al riñón. Además, la

angiotensina II estimula la síntesis de ET-1 y de NAD(P)H oxidasas, induciendo así la generación de ERO en las células endoteliales (Sasser y col., 2002; Taniyama y Griendling, 2003; Touyz y col., 2003; Savoia y col., 2011). La angiotensina II promueve también la síntesis del O_2^- en el endotelio vascular, responsable de la disminución de la síntesis de ON y, por tanto, de la disfunción del endotelio vascular (Pacurari y col., 2014). Todos estos fenómenos desencadenados por el exceso de angiotensina II potencian, a su vez, la severidad de la hipertensión.

La información expuesta pone de manifiesto la enorme complejidad de los mecanismos celulares y moleculares implicados en la hipertensión que actúan de manera cooperativa contribuyendo a la patogénesis de esta enfermedad (Figura 1). Debido a esta interconexión, la producción de ingredientes vegetales que inhiban el estrés oxidativo y la inflamación, así como la ECA, tiene un indudable interés científico y tecnológico, ya que podría constituir una herramienta clave para la prevención y control de la hipertensión.

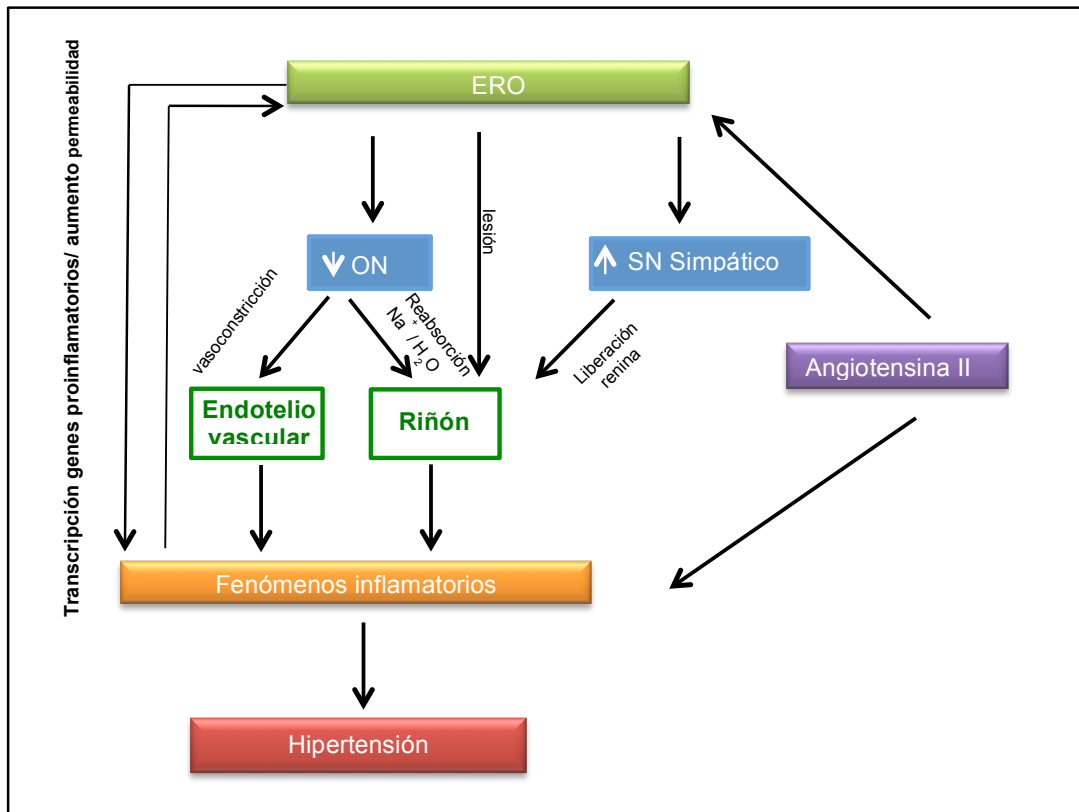


Figura 1. Relación entre la angiotensina II, el estrés oxidativo y la inflamación y su implicación en la patogénesis de la hipertensión

3.3. Prevención de la hipertensión

La prevención y control de la hipertensión requiere de abordajes multiestratégicos apoyados por políticas sanitarias gubernamentales que vayan dirigidos a reducir los factores de riesgo de la población. La identificación clínica de individuos de alto riesgo mediante estudios integrados en los sistemas sanitarios que permitan su control y tratamiento es crucial para reducir la prevalencia de la hipertensión y las ECV (OMS, 2008). Además, de forma simultánea se han desarrollado estrategias preventivas para la población general que incluyen modificaciones del estilo de vida (Åkesson y col., 2014). Las recomendaciones sobre un estilo de vida saludable son similares en la mayoría de los países e incluyen: 1) consumo de alcohol moderado; 2) dejar de fumar; 3) actividad física regular; 4) controlar el peso corporal; 5) restringir el consumo de sal; 6) aumentar el consumo de verduras, hortalizas y frutas; 7)

aumentar el consumo de pescado y 8) reducir el contenido de grasa saturada/grasa total (Kokubo, 2014).

Las recomendaciones sobre el consumo de alcohol aconsejan no superar una ingesta de 20-30 g etanol/día para hombres y de 10-20 g etanol/día para mujeres (Sociedad Europea de Hipertensión Arterial, 2013). Por otro lado, estudios epidemiológicos concluyen que la tensión arterial y la frecuencia cardíaca de individuos normotensos e hipertensos fumadores sin tratar es significativamente más alta que la de individuos no fumadores (Groppelli y col., 1992; Minami y col., 1999), por tanto, dejar de fumar reduce el riesgo de hipertensión y ECV. En general, la práctica de ejercicio físico aeróbico de forma regular es eficaz como estrategia preventiva contra las ECV (Hamer y Chida, 2008) ya que reduce o revierte el estrés oxidativo (Radak y col., 2004), la lipogénesis hepática (Fiebig y col., 2002) y la adipogénesis (Schultz y col., 2012).

Entre las políticas y estrategias para favorecer una alimentación saludable destaca la reducción del consumo de sal. La cantidad de sal consumida es determinante en los niveles de presión sanguínea ya que una ingesta de sal elevada está relacionada con el aumento del volumen extracelular y la resistencia vascular (Majid y col., 2015). La OMS recomienda limitar el consumo de sal a 5 g diarios (equivalente a 2 g de sodio diarios) al demostrarse que dicha reducción ayuda a disminuir la presión arterial sistólica tanto en individuos normotensos (-1 a -2 mm Hg) como en hipertensos sensibles a la sal (4-5 mm Hg) (Kokubo, 2014). La magnitud de la reducción de sal está correlacionada positivamente con la magnitud de la reducción de los niveles de presión sanguínea en un rango de 3 a 12 g de sal diarios (OMS, 2008). Por otro lado, está demostrado que los alimentos ricos en potasio tales como guisantes, frutos secos, coles o espinacas, ayudan a disminuir la tensión arterial por lo que se recomienda un consumo mínimo de 3,5 g diarios (Sociedad Europea de Hipertensión Arterial, 2013).

Diferentes sociedades y asociaciones internacionales (International Atherosclerosis Society, American Heart Association/American College of

Cardiology, National Lipid Association, American Diabetes Association, Obesity Society) recomiendan el consumo de verduras y hortalizas, frutas, cereales integrales, leguminosas, productos lácteos desnatados, pollo, pescado, aceites vegetales y frutos secos y limitar la ingesta de grasas saturadas, dulces, bebidas azucaradas, sal y carnes rojas. Diversos estudios demuestran que las dietas que cumplen con estos patrones de alimentos, como por ejemplo la dieta DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension) y la Dieta Mediterránea reducen los factores de riesgo cardiometabólico: marcadores de inflamación, hipertensión e hipercolesterolemia (Ginter y Simko, 2015; Widmer y col., 2015). Además, está ampliamente demostrado que la sustitución de alimentos con ácidos grasos saturados o trans por alimentos con ácidos grasos mono- y poliinsaturados contribuye a la prevención y tratamiento de las ECV (Siri-Tarino y col., 2015).

Con el creciente reconocimiento de los beneficios saludables de algunos compuestos bioactivos presentes en los alimentos, existe un gran interés en el desarrollo de nuevos productos funcionales enriquecidos en compuestos saludables. Estos alimentos entran dentro de la categoría de alimentos funcionales que han sido definidos por el “International Life Science Institute” (ILSI) como “aquellos alimentos que aportan efectos beneficiosos sobre una o más funciones fisiológicas vitales, más allá de los efectos puramente nutricionales, y que van encaminados a mejorar el estado de salud y bienestar de un individuo y/o a reducir el riesgo de padecer enfermedades” (Diplock, 1999). Estos alimentos deben ser consumidos dentro de una dieta equilibrada y sana y en las mismas cantidades en las que habitualmente se consumen el resto de alimentos (Academy of Nutrition and Dietetics, 2014).

La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) presenta una gran rigidez en cuanto a la aprobación de alegaciones de salud en los alimentos. Por este motivo, en el mercado Europeo sólo se pueden encontrar unos pocos alimentos que aleguen reducir el riesgo de hipertensión. Estos alimentos hasta el momento incluyen exclusivamente productos lácteos fermentados que contienen los péptidos iso-pro-pro (IPP) y val-pro-pro (VPP). Dichos tripéptidos

son capaces de reducir moderadamente los niveles de presión sanguínea (-2,95 mm Hg y -1,15 mm Hg para la sistólica y diastólica, respectivamente), tal y como demuestra un meta-análisis reciente de 33 estudios clínicos en individuos normotensos e hipertensos (Fekete y col., 2015). Actualmente, estos alimentos funcionales se comercializan en diferentes países bajo las marcas Evolus® (Finlandia), vitaTEN® (España), Emmi-Evolus® (Portugal) y Calpis (Japón).

Dada la escasa diversidad de alimentos funcionales para cubrir la creciente demanda por parte de los consumidores es necesario seguir apostando por nuevas actividades de I+D que impulsen el desarrollo de ingredientes/alimentos funcionales que disminuyan el riesgo de padecer ECV.

3.4. Las leguminosas en la prevención de las enfermedades cardiovasculares

Las leguminosas, también denominadas legumbres, son plantas que pertenecen a la familia *Leguminosae* e incluyen entre otras la alfalfa, el trébol, el altramuz, judías, guisantes, cacahuetes, soja, garbanzos, habas y lentejas. La Food and Agriculture Organization (FAO) limita la definición de legumbres a aquellos cultivos donde se recolecta el grano seco excluyendo los guisantes frescos y judías verdes que son clasificados como verduras. También se excluyen de la definición de legumbres aquellos cultivos utilizados para la extracción de aceite como la soja y el cacahuete, y los utilizados con fines de siembra como la alfalfa y el trébol. Actualmente, el área de producción anual de legumbres es de 78 MHa y la producción total mundial representa 70 MTm (Vaz Patto y col., 2014). Las leguminosas representan un alimento importante en la dieta de la población mundial, en especial en los países menos desarrollados donde es una fuente indispensable de proteínas. En Europa, el mayor consumo de leguminosas se encuentra en la zona del Mediterráneo siendo las más consumidas las lentejas (*Lens culinaris* L.), judías (*Phaseolus vulgaris* L.), garbanzos (*Cicer arietinum* L.) y habas (*Vicia faba* L.). De este modo, mientras que en el área del Mediterráneo el consumo diario per cápita de leguminosas está entre 8 y 23 g, en el norte de Europa el consumo diario es inferior a 5 g por habitante (Bouchenak y Lamri-Senhadji, 2013).

A pesar de su indiscutible valor nutricional, durante el siglo XX el consumo de las leguminosas disminuyó en la mayoría de los países industrializados debido a su baja digestibilidad y largo tiempo de cocinado (Sanchez-Chino y col., 2015), siendo este último motivo el más importante en una sociedad donde se dedica muy poco tiempo a la preparación de alimentos. En la última década, la situación está cambiando lentamente debido a la aparición de nuevas tendencias en la elección de alimentos motivadas por la sostenibilidad y la preocupación por el bienestar y el estado de salud (Aiking, 2011; Boland y col., 2013).

Las leguminosas aportan una amplia variedad de beneficios saludables, especialmente en la prevención de factores de riesgo cardiometabólicos como la dislipemia y la hipertensión. La mayoría de las investigaciones en estas dos áreas se han centrado en la soja (Sirtori y col., 2007; Jenkins y col., 2010) lo que permitió que la Food and Drug Administration (FDA) aprobase en 1999 la alegación de salud sobre el consumo de proteína de soja y el menor riesgo de enfermedades coronarias (FDA, 1999). Sin embargo, en los últimos años se han publicado un mayor número de estudios clínicos y experimentales que demuestran la efectividad de otras leguminosas en la prevención de hiperlipemias (Tabla 2) e hipertensión (Tabla 3). Estos estudios de intervención dietética se llevaron a cabo con diversos alimentos como semillas de leguminosas enteras, bebidas obtenidas a partir de semillas, productos de panadería elaborados con harina de leguminosas y suplementos de fibra o aislados de proteína de leguminosas. En general, los estudios clínicos en humanos indican que una dieta rica en leguminosas o en sus componentes es capaz de disminuir los niveles sanguíneos de colesterol total y unido a LDL, aumentar la concentración de colesterol unido a HDL y reducir la presión sistólica y diastólica.

La inflamación vascular crónica es parte de la fisiopatología de las ECV y, sobre todo, de la hipertensión y aterosclerosis (Siti y col., 2015). Las leguminosas pueden contribuir a la prevención de dichas enfermedades debido a las propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes de sus constituyentes. El

efecto positivo del consumo de soja sobre la reducción de marcadores de inflamación está bien demostrado (Azadbakht y col., 2008; Beavers y col., 2009; Miraghajani y col., 2012), sin embargo, existen menos estudios sobre el efecto antiinflamatorio de leguminosas. Un meta-análisis reciente de 9 estudios de intervención cruzados y paralelos indica que el consumo de leguminosas muestra una tendencia a la reducción de los niveles de marcadores de inflamación como la proteína reactiva C, sin embargo, la heterogeneidad de los estudios es alta (Salehi-Abargouei y col.). Además, existen unos pocos estudios en los que se muestra el efecto del consumo de leguminosas en otros marcadores de inflamación como IL-6, IL-18, TNF- α y los receptores I y II del factor de necrosis tumoral (sTNFR I y sTNFR II) (Hermsdorff y col., 2011; Nilsson y col., 2013; Hosseinpour-Niazi y col., 2015). Los resultados más relevantes de estos estudios indican que una dieta rica en leguminosas y bajo índice glicémico contribuye a una modesta reducción de las concentraciones de TNFR II, TNF- α , IL-6 e IL-18. Las leguminosas contienen compuestos antioxidantes como los polifenoles, la vitamina E y el ácido fólico (Bouchenak y Lamri-Senhadji, 2013) que pueden jugar un papel clave en la prevención de enfermedades cardiovasculares. El efecto de las leguminosas en ciertos marcadores de estrés oxidativo aún no está claro. Existen evidencias científicas que demuestran que el consumo regular de leguminosas reduce significativamente algunos marcadores de estrés oxidativo (LDL oxidada, malonaldehído) en diabéticos (Fallah Noroozinejad y col., 2015). Sin embargo, un estudio reciente en obesos que seguían una dieta rica en leguminosas no mostró cambios significativos en diversos marcadores de estrés oxidativo (Safaeiyan y col., 2015).

Tabla 2: Ensayos clínicos de intervención que muestran el efecto del consumo de leguminosas en los niveles séricos de lípidos

Diseño Experimental/Individuos participantes	Dieta	Dosis	Duración (días)	Efecto observado	Referencia
Paralelo ciego/ Mujeres (n=23) y hombres (n=20) con hipercolesterolemia moderada	Dieta habitual suplementada con barra de dietética a base de aislado proteico de altramuz	35 g de proteína/d	42	Reducción del colesterol total (-19,2 mg/dL) y unido a LDL (-12,0 mg/dL). Aumento de colesterol unido a HDL (+14,7 mg/dL)	(Weisse y col., 2010)
Paralelo/Hombres (n=17) y mujeres (n=13) con obesidad	Dieta hipocalórica rica en lentejas, garbanzos o guisantes cocidos	160-235 g, 4 veces/semana	56	Reducción del colesterol total (-25 mg/dL) y unido a LDL (-14,0 mg/dL)	(Hermsdorff y col., 2011)
Cruzado/Hombres (n=30) y mujeres (n=57) con masa corporal de 76 ± 16 kg	Dieta rica en judías, garbanzos, guisantes o lentejas cocinadas	250 g/d	150	Reducción del colesterol total (-17,8 mg/dL)	(Abeysekara y col., 2012)
Paralelo doble ciego/Hombres y mujeres postmenopáusicas con hiperlipidemia (n=25)	Dieta baja en grasa suplementada con barras dietéticas ricas en proteína de altramuz	2 barras/d (70 g de proteína/d)	28	Reducción del colesterol total (-11,6 mg/dL)	(Sirtori y col., 2012)
Cruzado/ Mujeres pre- (n=13), post-menopáusicas (n=19) y hombres (n=13) hipercolesterolémicos	Dieta rica en garbanzos cocidos	182 g (4 veces por semana)	120	Reducción del colesterol total (-7,7 mg/dL) y unido a LDL (-7,3 mg/dL)	(Pittaway y col., 2008)
Cruzado/Mujeres con sobrepeso e índice glucémico en ayunas normal (n=46)	Dieta rica en cebada, judías y garbanzos	Judías (86 g/d), garbanzos (82 g/d), productos integrales (58 g/d) y pan (216 g/d) de cebada	30	Reducción de los niveles de triglicéridos (4%), colesterol total (12%) y unido a LDL (-11%)	(Tovar y col., 2014)
Paralelo/ Hombres (n=13) y mujeres (n=13) con enfermedad arterial periférica	Dieta rica en judías, guisantes, lentejas y garbanzos cocidos	½ taza al día de leguminosas cocinadas	56	Reducción del colesterol total (5%) y unido a LDL (8,7%)	(Zahradka y col., 2013)
Metaanálisis de 26 ensayos clínicos (n= 1037)	Dieta rica en judías, garbanzos, lentejas y guisantes	Consumo medio de 130 g/d	30-365	Reducción de colesterol unido a LDL (-0,17 mmol/L, intervalo de confianza al 95% -0,25 a -0,09 mmol/L).	(Ha y col., 2014)

Tabla 3. Cambios en la presión arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) y media (PAM) expresada en mm Hg con el consumo de dietas ricas en leguminosas.

Diseño experimental/Individuos participantes	Dieta	Duración (días)	Dosis	Diferencia media entre grupo de intervención y control (intervalo de confianza al 95%)			Referencias
				PAS	PAD	PAM	
Paralelo/Mujeres y hombres obesos (n=18)	Dieta rica en lentejas, garbanzos, guisantes y judías	56	113 g/d	-8,9 (-14,04, -3,73)	-2,60 (-8,70, 3,5)	-2,70 (-8,70, -3,5)	(Abete y col., 2009)
Cruzado/ Hombres y mujeres sanos (n=82)	Dieta rica en lentejas, garbanzos, guisantes y judías	56	250 g/d	2,00 (-1,00, 5,00)	1,00 (-1,00, 3,00)	1 (0,84, 1,16)	(Abeysekara y col., 2012)
Paralelo/ Mujeres y hombres con sobrepeso u obesos (n=131)	Dieta rica en altramuz	365	123 g/d	-8,9 (-14,04, -3,73)	-1,00 (-1,84, -0,16)	-0,80 (-0,96, -0,64)	(Belski y col., 2011)
Paralelo/Mujeres y hombres con síndrome pre-metabólico (n=132)	Dieta rica en lentejas, garbanzos, guisantes y judías	112	81 g/d	-1,3 (-2,36, -0,24)	0,18 (-2,23, 2,59)	-3,40 (-4,26, -2,54)	(Gravel y col., 2010)
Paralelo/ Mujeres y hombres obesos (n=30)	Dieta rica en lentejas, garbanzos, guisantes y judías	56	113 g/d	1,6 (-11,67, -0,53)	-2,00 (-3,84, -0,16)	-0,60 (-0,84, -3,36)	(Hermsdorff y col., 2011)
Paralelo/ Mujeres y hombres con diabetes mellitus tipo 2 (n=121)	Dieta rica en lentejas, garbanzos, guisantes y judías	84	211 g/d	-4,50 (-7,01, -1,99)	-3,10 (-4, 81, -1,3)	-0,60 (-0,84, -3,36)	(Jenkins y col., 2012)
Paralelo/ Hombres y mujeres con sobrepeso u obesos (n=74)	Dieta rica en altramuz	112	132 g/d	-3,00 (-5,57, -0,43)	0,60 (-1,01, 2,21)	-0,20 (-0,87, 0,47)	(Lee y col., 2009)
Cruzado/Mujeres y hombres sanos (n=26)	Dieta rica en lentejas, garbanzos, guisantes y judías	29	275 g/d	-1,60 (-6,19, -2,99)	0,39 (-1,90, 2,68)	-0,75 (-1,44, -0,06)	(Veenstra y col., 2010)
Cruzado/Mujeres con sobrepeso e índice glucémico en ayunas normal (n=46)	Dieta rica en cebada, judías y garbanzos	30	Judías (86 g/d), garbanzos (82 g/d), productos integrales (58 g/d) y pan (216 g/d) de cebada	-2	-3	-	(Tovar y col., 2014)
Hombres y mujeres con sobrepeso (n=113)	Leguminosas y cereales integrales	182	2 raciones de leguminosas o 4 raciones de cereales	-1,1 (-4,9, 2,8)	-0,9 (-3,6, 1,8)	-	(Venn y col., 2010)
Individuos obesos, con sobrepeso, sanos, síndrome premetabólico (n=554)	Meta-análisis de 8 ensayos de intervención dietética con leguminosas	60-365	81-275 g/d	-2,25 (-4,22, -0,28)	-0,71 (-1,74, 0,31)	-0,75 (-1,44, -0,06)	(Jayalath y col., 2014)

3.5. Componentes de las leguminosas relevantes en el control de la presión sanguínea

La composición de las leguminosas incluye aproximadamente un 55-65% de su peso seco (p.s.) como carbohidratos, principalmente en forma de almidón, a excepción del altramuz donde predomina la fibra (Bouchenak y Lamri-Senhadji, 2013). El contenido de proteína varía de un 20% p.s. en lentejas y judías hasta un 38-40% p.s. en el altramuz (Boye y col., 2010). El contenido en grasa total también varía ampliamente desde < 5% p.s. en judías hasta un 47% p.s. en la soja (Bouchenak y Lamri-Senhadji, 2013). Las leguminosas contienen cantidades sustanciales de vitaminas del grupo B y minerales importantes para la salud como el hierro, el calcio y el potasio, así como otros compuestos minoritarios entre los que se incluyen los inhibidores de proteasas, amilasas, lectinas, oligosacáridos y compuestos fenólicos (Rebello y col., 2014). La composición nutricional de las leguminosas cocinadas varía con respecto al grano crudo. Así una ración de leguminosas cocinadas (125 g) aporta hasta 15 g de proteína (15% de la ingesta diaria recomendada), 12 g de fibra (40% de la ingesta diaria recomendada), 67 mg de fitoesteroles (26% de la ingesta diaria recomendada), 590 mg de ácido α -linolénico (35% de la ingesta diaria recomendada) y 12 mg de polifenoles (48% de la ingesta diaria recomendada) (Arnoldi y col., 2015). Todos estos componentes pueden contribuir de una u otra manera a los efectos beneficiosos de las leguminosas en la prevención de las ECV. En los siguientes apartados se incluye información de los compuestos de leguminosas con actividades fisiológicas importantes en el control de la presión sanguínea que se considerarán en esta Tesis Doctoral.

3.5.1 Proteínas

Las proteínas de las leguminosas se pueden clasificar en función de su solubilidad en albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas (Duranti, 2006). Las globulinas y albúminas son solubles en soluciones salinas y acuosas, respectivamente, mientras que las prolaminas son solubles en alcohol y las glutelinas en soluciones ácidas y alcalinas (Duranti, 2006; Boye y col., 2010). Las proteínas mayoritarias de las leguminosas se clasifican en 11S (tipo

legumina) y 7S (tipo vicilina) en base a su coeficiente de sedimentación. Estas proteínas son deficitarias en aminoácidos azufrados (Met y Cys) y aromáticos (Trp), sin embargo, contienen una concentración significativa de Lys. Las albúminas incluyen diferentes enzimas, inhibidores de proteasas, amilasas y lectinas (Arnoldi y col., 2015). Las prolaminas y glutelinas son fracciones proteicas minoritarias en las leguminosas llegando a alcanzar el 10% del total de proteínas. Las proteínas de las leguminosas también presentan diferencias en su estructura, secuencia de aminoácidos y peso molecular. Así, dependiendo de la especie o variedad de leguminosa el perfil proteico varía (Arnoldi y col., 2015).

Estudios observacionales muestran una fuerte asociación entre la ingesta de proteínas de leguminosas y la reducción de la presión sanguínea (Altorf-van der Kuil y col., 2010). Estos hallazgos son coherentes con los encontrados en estudios clínicos aleatorizados y controlados en los que se concluye que el intercambio isocalórico de carbohidratos por proteínas de leguminosas reduce la presión arterial diastólica y sistólica en individuos obesos con pre-hipertensión e hipertensión de grado 1 (Teunissen-Beekman y col., 2012). De forma similar, el consumo durante tres meses de un prototipo de bebida conteniendo 35 g de proteína de altramuz reducía significativamente la presión sanguínea sistólica y diastólica en sujetos hipertensos (Nowicka y col., 2006). El efecto hipotensor de la proteína de altramuz también se ha observado en individuos normotensos que consumían alimentos enriquecidos en esta leguminosa (Belski y col., 2011).

Los mecanismos que subyacen al efecto beneficioso de la proteína de leguminosas en la presión arterial aún no están claros. Algunas hipótesis sugieren que la ingesta de proteína está relacionada con la síntesis celular de canales iónicos que podrían tener una influencia indirecta en las rutas de regulación de la presión sanguínea (Stamler y col., 1996). Una elevada ingesta de proteína puede inducir natriuresis ocasionando una bajada de la presión sanguínea (He y col., 2005). Además de estas hipótesis, otros estudios indican que la suplementación de proteína en la dieta puede incrementar la concentración de los aminoácidos Tyr y Trp en regiones del cerebro o de la

pared de los vasos sanguíneos provocando una respuesta vasodilatadora (Anderson y Major, 2002). A su vez, el aminoácido Arg juega un papel muy importante en la vasodilatación porque se utiliza como sustrato en la síntesis de ON. Así, la actividad vasodilatadora observada en modelos animales de hipertensión tras el consumo de proteína de altramuz se relaciona con su alto contenido en Arg (Pilvi y col., 2006).

Estudios *in vivo* sugieren que la proteína de soja puede prevenir o atenuar el desarrollo de ECV mediante su actividad antioxidante (Manzoni y col., 2003) y anti-inflamatoria (Burriss y col., 2014). La globulina 7S de soja interacciona con la tioredoxina 1 y la ciclofilina B, dos componentes celulares que están implicados en la protección del organismo al estrés oxidativo (Manzoni y col., 2003). Más recientemente, se ha demostrado que la proteína de soja puede inhibir la respuesta inflamatoria dependiente del factor de transcripción NF- κ B (Burriss y col., 2014).

3.5.2. Péptidos bioactivos

Algunos autores sugieren que la reducción de la presión sanguínea asociada al consumo regular de leguminosas se atribuye, al menos en parte, a péptidos bioactivos (Arnoldi y col., 2015; Carbonaro y col., 2015). Numerosos estudios han puesto de manifiesto la presencia de péptidos con distintas actividades biológicas (inhibidora de la ECA y la renina, antioxidante y anti-inflamatoria) que se encuentran encriptados en la secuencia de las proteínas de leguminosas (López-Barrios y col., 2014), como puede observarse en la Tabla 4. Estos péptidos pueden ser liberados de la proteína parental durante la digestión gastrointestinal o durante los procesos de elaboración de alimentos (fermentación, digestión, hidrólisis enzimática y química) (Erdmann y col., 2008). Su estabilidad en las fases de absorción, distribución y metabolismo son requerimientos imprescindibles para que expresen su actividad *in vivo* (Hernández-Ledesma y col., 2011)

3.5.2.1. Péptidos antihipertensivos

El efecto antihipertensivo de péptidos derivados de proteínas de leguminosas ha sido demostrado en distintos estudios *in vivo* e *in vitro* (Tabla 4).

Concretamente, se han identificado secuencias procedentes de globulinas capaces de inhibir la ECA en ensayos *in vitro* e *in vivo*. La actividad biológica de estos péptidos se suele expresar en base a su valor de IC₅₀ que representa la concentración necesaria para inhibir el 50% de la actividad de dicha enzima. Aunque se desconoce el mecanismo exacto de inhibición, la mayoría de los estudios indica que los péptidos identificados hasta el momento son principalmente inhibidores competitivos del dominio C-terminal de la ECA. Por ejemplo, se ha identificado el péptido KEDDEEEEQGEEE, liberado durante la fermentación de guisante con *Lactobacillus plantarum* 299v el cual poseía aminoácidos cargados capaces de quelar el átomo de zinc del centro activo de la ECA (Jakubczyk y Baraniak, 2013) reduciendo su velocidad catalítica para hidrolizar la angiotensina I (Aluko, 2015b). La actividad inhibidora de la ECA de hidrolizados de guisante obtenidos con termolisina se relacionó directamente con la represión de la expresión de la enzima renina y la disminución de los niveles plasmáticos de angiotensina II y la disminución de la PAS y PAD en ratas Han:SPRD-cy, modelo animal de enfermedad renal crónica (Li y col., 2011b). Estudios sobre modelos de relación estructura-actividad cuantitativos (QSAR) han establecido algunas características estructurales que poseen los péptidos inhibidores de la ECA. Así por ejemplo, la presencia de aminoácidos con residuos hidrofóbicos en los últimos 3 aminoácidos del extremo C-terminal ha sido asociada a péptidos con alta actividad inhibidora de la ECA (Shahidi y Zhong, 2008). Se ha comprobado que los aminoácidos de cadenas aromáticas como Pro, Trp y Tyr son característicos del dominio C-terminal de los inhibidores, mientras que los aminoácidos hidrofóbicos con cadenas alifáticas como Leu, Val, Ile y Gly son afines al extremo N-terminal (Iwaniak y col., 2014). Además, los péptidos que contienen Arg o Lys en su extremo C-terminal, han sido relacionados con la reducción de los niveles de presión sistólica en pacientes hipertensos dado que estos aminoácidos son precursores del ON (Kwak y col., 2013). Por último, estudios de cristalografía han demostrado que péptidos de gran tamaño no pueden introducirse fácilmente en el centro activo de la ECA (Natesh y col., 2003), lo que sugiere que los péptidos con una potente actividad inhibidora de la ECA son secuencias cortas de entre 2 y 12

residuos de aminoácidos (Hernández-Ledesma y col., 2011). Un mecanismo adicional por el que los péptidos de leguminosas pueden reducir la presión sanguínea es inhibiendo la enzima renina. Por ejemplo, los dipéptidos IR, KF y EF presentes en hidrolizados de guisantes obtenidos con Alcalasa son potentes inhibidores no sólo de la ECA sino también de la renina *in vitro* (Li y Aluko, 2010). La actividad de dichos péptidos se relacionó con la presencia de aminoácidos hidrofóbicos y aminoácidos cargados positivamente. Más recientemente, un estudio demostró que la administración oral (30mg/kg de peso corporal) de 3 péptidos derivados de la hidrólisis de proteínas de guisante con termolisina y con potente actividad inhibidora de la renina *in vitro* son eficaces en la reducción de la PAS y PAD en ratas espontáneamente hipertensas (Aluko, 2015b).

3.5.2.2. Péptidos con actividad antioxidante

Estudios clínicos con individuos hipertensos confirman que la producción de O_2^- y el H_2O_2 , reducen la síntesis de ON en el endotelio vascular y la biodisponibilidad de los antioxidantes endógenos (Touyz, 2004). Por tanto, los péptidos alimentarios con propiedades antioxidantes también podrían contribuir en la modulación de la presión sanguínea.

Existen numerosos estudios *in vitro* que muestran la actividad antioxidante de hidrolizados proteicos, fracciones peptídicas o péptidos de leguminosas (Tabla 4), si bien ningún estudio ha evaluado la eficacia de péptidos antioxidantes derivados de leguminosas en humanos. Estos trabajos indican que los péptidos derivados de leguminosas pueden inhibir las reacciones de oxidación de macromoléculas (lípidos, proteínas, etc) mediante diferentes mecanismos como la neutralización de radicales libres por donación de protones o electrones o la quelación de iones metálicos (Singh y col., 2014). Por ejemplo, los péptidos RQSHFANAQP, DHG y VGDI obtenidos por hidrólisis enzimática de las proteínas de garbanzo (Kou y col., 2013; Ghribi y col., 2015) son capaces de donar protones a radicales libres debido a la presencia de Asp que posee grupos carboxilo en sus cadenas laterales (Suetsuna y col., 2000). Además, el péptido DHG contiene His, aminoácido que cede electrones a los radicales

libres transformándolos en moléculas estables (Rajapakse y col., 2005). Los péptidos FDIRA y YPNQKV obtenidos tras la hidrólisis de frijol alado tienen la capacidad de actuar como donadores de electrones debido a su composición en aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos. Así mismo, el péptido FDIRA prestó alta capacidad para quelar iones metálicos debido a su contenido en aminoácidos básicos y ácidos (Yea y col., 2014). Como se deduce de todos estos estudios, la actividad antioxidante de los péptidos está determinada por las propiedades físicas y químicas de las secuencias de aminoácidos por los que estos están formados (Huang y col., 2013). Aunque hay que tener en cuenta que todos los aminoácidos que conforman los péptidos pueden interactuar con los radicales libres si la energía del radical libre es alta, la naturaleza de cada aminoácido influye en los niveles de actividad antioxidante de los péptidos (Elias y col., 2008). La presencia de aminoácidos básicos (His y Arg) y aminoácidos aromáticos (Tyr, Trp y Phe) en la secuencia peptídica puede potenciar la actividad antioxidante debido a que los grupos imidazol, fenol e indol de estos residuos de aminoácidos, donan protones al radical deficiente para conseguir mantener la estabilidad molecular (Samaranayaka y Li-Chan, 2011). La hidrofobicidad de los aminoácidos es también un factor determinante en la actividad antioxidante de los péptidos. Al parecer, los péptidos que contienen residuos hidrofóbicos (Ala, Ile, Leu y Val) en el extremo N-terminal son más activos (Power y col., 2013). Además los residuos hidrofóbicos aumentan la solubilidad de los péptidos en matrices lipídicas facilitando la captación de los radicales libres hidrofóbicos o ácidos grasos poliinsaturados (Elias y col., 2008). Otro factor influyente en la actividad antioxidante de los péptidos es su configuración. Así, por ejemplo, la sustitución de L-His por D-His en un péptido supone una reducción de su actividad (Chen y col., 1996). De hecho cuando el residuo His se encuentra situado en el dominio C-terminal, la actividad del péptido disminuye (Chen y col., 1995). Por otro lado, se conoce que los aminoácidos básicos tienen capacidad para quelar iones metálicos (Malaguti y col., 2014).

3.5.2.3. Péptidos con actividad anti-inflamatoria

La hidrólisis de proteínas de leguminosas con ciertas enzimas de grado alimentario da lugar a la producción de péptidos con actividad anti-inflamatoria. Por ejemplo, varios péptidos identificados en hidrolizados de judía de las variedades Negro 8025 y Pinto Durango reducen la producción de marcadores inflamatorios (ON, prostaglandina E2) y expresión de enzimas proinflamatorias (ciclooxigenasa 2, COX-2, y óxido nítrico sintasa inducible, ONSi) en cultivos de macrófagos RAW267.4 activados con lipopolisacárido de *E. coli* (Oseguera-Toledo y col., 2011) Por otra parte, hidrolizados de proteínas de altramuza producidos con Izyme AL y Alcalasa 2.4L son capaces de inhibir *in vitro* enzimas implicadas en los procesos inflamatorios (ciclooxigenasa 2, transglutaminasa, fosfolipasa A2 y trombina), atenuar la expresión de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1 β) y estimular la expresión de genes marcadores antiinflamatorios (ligando de quimiocina 18, CCL18).

Tabla 4: Actividad biológica de hidrolizados proteicos de leguminosas obtenidos con distintas enzimas.

Leguminosa	Enzimas	Actividad biológica	Referencia
Judías de las variedades Plus Black, Azufrado Higuera y Pinto Saltillo	Alcalasa y Flavourzyme	Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I: Plus Black (IC ₅₀ = 4,34 µg/mL) Azufrado Higuera (IC ₅₀ = 4,82 µg/mL) Pinto Saltillo (IC ₅₀ = 25,9 µg/mL) Antioxidante Antimicrobiana	(Ariza-Ortega y col., 2014)
Judía común	Pepsina y Pancreatina	Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I: GLTSK (IC ₅₀ =65,4 µM) LSGNK (IC ₅₀ =130,6 µM) GEGSGA (IC ₅₀ =113,7 µM) MPACGSS (IC ₅₀ =191,5 µM) MTEEY (IC ₅₀ =90,3 µM) Antioxidante	(Luna-Vital y col., 2015a)
Judía amarga	Alcalasa	Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I Antioxidante	(Siow y Gan, 2013)
Judía Africana yam	Alcalasa	Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I Inhibición de la renina Antioxidante	(Ajibola y col., 2013)
Judía Azufrado Higerá	Alcalasa Termolisina Pancreatina	Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I: Hidrolizado con Alcalasa (IC ₅₀ =0,19µg/mL) Hidrolizado con Termolisina (IC ₅₀ =0,11µg/mL) Hidrolizado con Pancreatina (IC ₅₀ =60,36µg/mL) Antioxidante	(Valdez-Ortiz y col., 2012)
Judía roja	Alcalasa-Papaina	Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I: PVNNPQIH: (IC ₅₀ =206,7µM)	(Rui y col., 2013)
Judía común	Pepsina	Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (IC ₅₀ =633µg/mL)	(Boschin y col., 2014a)
Judía Jamapa	Alcalasa	Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (IC ₅₀ =0,0191mg/mL)	(Hernandez-Alvarez y col., 2013)
Judía Negra Jamapa	Alcalasa-Flavourzyme Pepsina-Pancreatina	Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I Hidrolizado con Alcalasa-Flavourzyme (IC ₅₀ = 4,5mg/mL) Hidrolizado con Pepsina-Pancreatina: (IC ₅₀ =6,2mg/mL) Antioxidante	(Betancur-Ancona y col., 2014)
Judía caupí	Flavourzyme	Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (IC ₅₀ = 31 µg/mL) Antioxidante	(Segura Campos y col., 2010)

Tabla 4: (Continuación) Actividad biológica de hidrolizados proteicos de leguminosas obtenidos con distintas enzimas.

Leguminosa	Enzimas	Actividad biológica	Referencia
Frijol alado	Papaína	Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I YPNQKV (Inhibición 86,5% vs. control) FDIRA (Inhibición 73,8% vs. control) Antioxidante	(Yea y col., 2014)
Aislado proteico de guisante	Alcalasa	Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I IR (IC ₅₀ = 0,25mM); KF (IC ₅₀ =7,23mM); EF (IC ₅₀ = 2,98mM) Inhibición de la renina IR (IC ₅₀ =9,2 mM); KF (IC ₅₀ = 17,84 mM); EF (IC ₅₀ = 22,66 mM)	(Li y Aluko, 2010)
Guisante	Pepsina	Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (IC ₅₀ = 595 µg/mL)	(Boschin y col., 2014a)
Aislado de proteína de guisante (85% proteína)	Termolisina	Reducción de la presión sistólica (5-6mm Hg) en humanos consumiendo 3g hidrolizado/día	(Li y col., 2011a)
Aislado comercial de proteína de guisante (Propulse™)	Termolisina	Inhibición de las enzimas convertidora de angiotensina I y renina LTFFPG (20,2 y 41,4% de inhibición, respectivamente) IIPLEN (5,72 y 21% de inhibición, respectivamente) LSSGDVF (6 y 0,0 % de inhibición, respectivamente) IFENLQN (87,5 y 17,4% de inhibición, respectivamente) FEGTVFENG (76,7 y 49,9% de inhibición, respectivamente)	(Aluko y col., 2015b)
Guisante	Termolisina	Antioxidante (NRYHE)	(Pownall y col., 2010)
Garbanzo	Pepsina+Pancreatina	Antioxidante (ALEPDHR, TETWNPNHPEL, FVPH y SAEHGSLH)	(Torres-Fuentes y col., 2015)
Garbanzos	Pepsina	Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (IC ₅₀ = 673µg/mL)	(Boschin y col., 2014a)
Lenteja	Pepsina	Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (IC ₅₀ = 606 µg/mL)	(Boschin y col., 2014a)
Lenteja roja y verde	Papaína Pepsina /tripsina + α-Quimotripina	Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I Hidrolizado Papaína de lenteja verde (IC ₅₀ =0,086 mg/mL) Hidrolizado pepsina, tripsina α-quimotripina de lenteja roja (IC ₅₀ =0,053 mg/mL)	(Barbana y Boye, 2011)
Altramuz azul	Pepsina + Tripsina Pepsina Quimotripsina	Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I <i>Lupinus albus</i> (Pepsina + Tripsina): IC ₅₀ =202µg/mL <i>Lupinus angustifolius</i> (Pepsina): IC ₅₀ =185µg/mL <i>Lupinus luteus</i> (Quimotripsina): IC ₅₀ =136 µg/mL	(Boschin y col., 2014b)
Soja	Alcalasa	Antioxidante Antiinflamatoria	(Vernaza y col., 2012)
Soja	Pepsina	Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (IC ₅₀ = 224 µg/mL)	(Boschin y col., 2014a)
Formulas infantiles de soja	Pepsina + Pancreatina	Antioxidante	(Puchalska y col., 2014)

3.5.3. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas caracterizados por tener un anillo aromático con al menos una cadena lateral funcional y un radical hidroxilo (Amarowicz y Pegg, 2008). Este grupo heterogéneo de compuestos puede ser clasificado teniendo en cuenta la estructura química de su esqueleto carbonado en (a) compuestos fenólicos flavonoideos, que incluyen antocianinas, flavonas, flavonoles, flavanonas e isoflavonas; (b) compuestos fenólicos no flavonideos como los ácidos y aldehídos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos; (c) los compuestos fenólicos polimerizados entre los que se encuentran ligninas y taninos y (d) compuestos fenólicos minoritarios como las xantonas y quinonas entre otras. El grupo más extendido de compuestos fenólicos en los vegetales son los flavonoides, siendo los flavonoles los que mayor actividad antioxidante presentan (Guemes Vera y col., 2015). Los compuestos fenólicos pueden estar presentes en la naturaleza de forma soluble o insoluble. Los compuestos fenólicos insolubles son los que presentan mayor actividad antioxidante encontrándose unidos covalentemente por enlaces éster o éter a los componentes estructurales de la pared celular (polisacáridos o proteínas) (Acosta-Estrada y col., 2014).

El perfil fenólico de las leguminosas varía según la especie y variedad de leguminosa y condiciones edafoclimáticas durante su cultivo (Dueñas y col., 2007). Las lentejas destacan por tener mayores concentraciones de compuestos fenólicos, seguido de las judías rojas y negras (Campos-Vega y col., 2010). En general, los principales compuestos fenólicos de las leguminosas son los ácidos fenólicos, los flavonoides y las procianidinas localizados en mayor concentración en la testa de la semilla (Amarowicz y Pegg, 2008). Los ácidos fenólicos presentes en las leguminosas se encuentran predominantemente como ácido ferúlico, *p*-cumárico y siríngico en forma de ésteres solubles o unidos a componentes de la pared celular. Entre las leguminosas más ricas en ácidos fenólicos destacan la judía común (*Phaseolus vulgaris*), la judía carilla (*Vigna sinensis*) y la judía lima (*Phaseolus lunatus*) (Vaz Patto y col., 2014).

Los principales flavonoides descritos en las leguminosas son glucósidos de flavanoles, flavan-3-oles, flavonas y antocianidinas, así como las isoflavonas en el caso de la soja (Vaz Patto y col., 2014). La presencia de antocianidinas es típica de semillas con la testa coloreada.

Los compuestos fenólicos de leguminosas podrían contribuir al control de la hipertensión a través de mecanismos de actividad antioxidante, anti-inflamatoria y antihipertensiva. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos de leguminosas está ampliamente reconocida en numerosos estudios *in vitro* (Durazzo y col., 2013; Zhao y col., 2014) e *in vivo* (Yao y col., 2012). Entre los mecanismos de actividad antioxidante descritos se encuentra la quelación de iones metálicos y neutralización de radicales libres por donación de protones o electrones. Además, retrasan la formación del O_2^- y de otras especies reactivas de oxígeno mediante la inhibición de enzimas oxidantes, la activación de enzimas antioxidantes o la inhibición de la señalización celular mediada por radicales (Rebello y col., 2014). Por ejemplo, se ha observado que la administración oral de ácido ferúlico a ratas espontáneamente hipertensas aumenta la actividad catalasa y superóxido dismutasa en el corazón y los riñones, mientras disminuye la concentración de creatinina plasmática y enzimas hepáticas en plasma, mejorando así la función de los vasos sanguíneos, corazón, hígado y riñones (Alam y col., 2013).

Los efectos antioxidantes de los compuestos fenólicos de leguminosas se extienden a proteínas relacionadas con la inflamación, como el NF- κ B y la COX-2 (Boudjou y col., 2013). En este sentido, se ha demostrado que los polifenoles de leguminosas reducen la vasoconstricción y las respuestas proinflamatorias y promueven la salud vascular reduciendo la degradación del ON mediada por el estrés oxidativo. En concreto, el ácido ferúlico produce un aumento de la biodisponibilidad del ON mediante la reducción de los niveles de TNF- α y la activación de la ONSe (Senaphan y col., 2015).

Los flavonoides quercetina y kanferol han demostrado tener actividad inhibidora de la ECA *in vitro* debido a que interaccionan con el ion zinc del centro activo formando un complejo con la enzima (Al Shukor y col., 2013). Estudios QSAR

han permitido conocer qué características estructurales de los compuestos fenólicos dan lugar a una mayor actividad inhibidora de la ECA. Concretamente, se ha identificado que los elementos estructurales responsables de la inhibición de la ECA por parte de los compuestos fenólicos son la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C, un grupo cetona en el C4 del anillo C y el grupo catecol del anillo B (Guerrero y col., 2012).

3.6. Hidrolizados proteicos

3.6.1. Características generales y aplicaciones

Los hidrolizados proteicos se definen como una mezcla de polipéptidos, oligopéptidos y amino ácidos que se producen a partir de diversas fuentes proteicas mediante hidrólisis parcial (Schaafsma, 2009). Los hidrolizados proteicos son muy apreciados como ingredientes en la formulación de diversos alimentos ya que presentan un alto valor nutricional y son digeridos y absorbidos de modo más eficiente que la proteína nativa (Grimble, 1994; Clemente, 2000) ya que existen sistemas de transporte específicos para péptidos a través de la membrana de las células intestinales (Aluko, 2015a). Además, los hidrolizados proteicos presentan, en ocasiones, mejores propiedades biológicas y tecnofuncionales (solubilidad, capacidad emulsionante y gelificante) que las proteínas de las que proceden (De Leo y col., 2009).

Los hidrolizados proteicos tienen diversas aplicaciones en nutrición humana al emplearse como ingredientes en bebidas energéticas, en productos para deportistas, para dietas de control de peso o dirigidos a ancianos (Frokjaer, 1994; Schaafsma, 2009), así como para la alimentación clínica de personas con malnutrición (Nesse y col., 2014) o desórdenes de la digestión, absorción y del metabolismo de aminoácidos (Clemente, 2000; McCarthy y col., 2013) Así mismo, el uso de hidrolizados proteicos en fórmulas infantiles hipoalergénicas está muy extendido, debido a que la hidrólisis enzimática causa una reducción de la antigenicidad proteica (Peñas y col., 2006b; Peñas y col., 2006d). En las últimas dos décadas, ha surgido un creciente interés en el empleo de

hidrolizados proteicos como ingredientes para la elaboración de alimentos funcionales o productos nutraceuticos (Saadi y col., 2015) ya que existen evidencias de que la hidrólisis de proteínas de origen animal o vegetal da como resultado la liberación de péptidos de cadena corta con un amplio rango de actividades biológicas (Hafeez y col., 2014; Aluko, 2015a; Bhat y col., 2015). De hecho, la incorporación de hidrolizados proteicos en los alimentos es una estrategia cada vez más empleada por la industria alimentaria para satisfacer la demanda de los consumidores de alimentos nutritivos con efectos beneficiosos para la salud.

En función de su grado de hidrólisis, los hidrolizados proteicos pueden clasificarse en: a) hidrolizados de bajo grado de hidrólisis (< 10%), que presentan mejores capacidades espumante y emulsionante que las proteínas parentales; b) hidrolizados de grado de hidrólisis variable, que se emplean como saborizantes y c) hidrolizados de elevado grado de hidrólisis (> 10%) que, generalmente, se emplean como ingredientes en suplementos alimentarios, fórmulas infantiles hipoalergénicas o fórmulas destinadas a personas con necesidades nutricionales especiales (Vioque y col., 2000). Estos hidrolizados contienen péptidos de bajo peso molecular, que son los preferidos en la formulación de alimentos funcionales ya que son más estables y resisten la digestión gastrointestinal, manteniendo su actividad biológica tras la digestión (Saadi y col., 2015).

3.6.2. Estrategias tecnológicas para la producción de hidrolizados proteicos

La producción de hidrolizados proteicos requiere la ruptura de los enlaces peptídicos contenidos en las proteínas, que puede realizarse mediante hidrólisis química (ácida o básica) o enzimática. La hidrólisis química presenta diversas desventajas, ya que es un proceso de difícil control que reduce la calidad nutricional de los hidrolizados obtenidos, destruye la forma L de los aminoácidos y produce sustancias tóxicas como la Lys-Ala. La hidrólisis enzimática, en cambio, se lleva a cabo en condiciones suaves de pH (6-8) y temperatura (40-60 °C), evitando las condiciones extremas que se requieren en

una hidrólisis química, de modo que la calidad nutricional de los hidrolizados no se ve afectada (Clemente, 2000; McCarthy y col., 2013). Además la hidrólisis enzimática presenta la ventaja de ser fácilmente reproducible debido a que permite un control total del proceso (Singh y col., 2014). Por ello, la hidrólisis enzimática es la estrategia más empleada para la producción de hidrolizados proteicos. Este tipo de hidrólisis puede llevarse a cabo mediante proteasas de grado alimentario o bien mediante procesos de fermentación, aprovechando las actividades enzimáticas de bacterias y hongos filamentosos fermentativos.

3.6.2.1. Hidrólisis enzimática

Esta estrategia implica la hidrólisis del sustrato proteico mediante una o más enzimas en las condiciones de temperatura y pH óptimas para cada proteasa, ocasionando la liberación de péptidos y amino ácidos libres (Power y col., 2013) (Figura 2). Es el procedimiento más común, rápido y seguro de producir hidrolizados proteicos con actividad biológica (de Castro y Sato, 2015). La composición del hidrolizado producido dependerá de diversos factores como son el tipo y la concentración del sustrato proteico, la relación enzima-sustrato, el tipo de enzima proteolítica, el tiempo de hidrólisis y las condiciones fisicoquímicas del proceso (pH, temperatura y velocidad de agitación) (Samaranayaka y Li-Chan, 2011; Power y col., 2013)

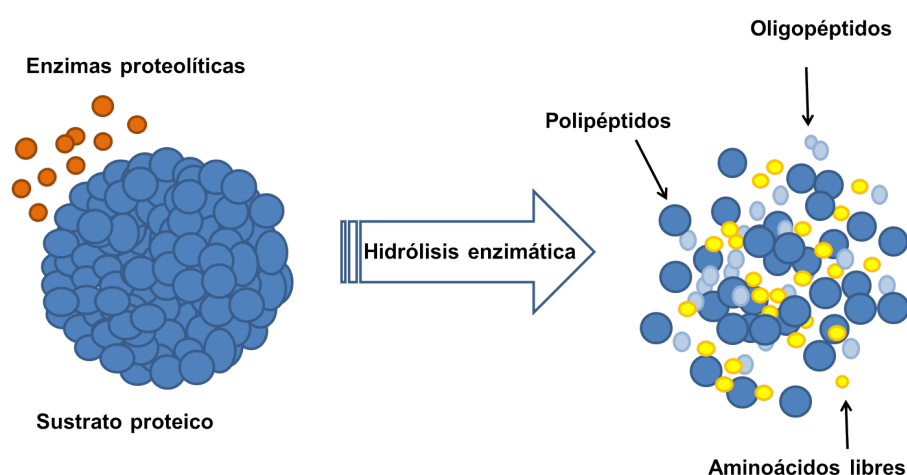


Figura 2. Producción de hidrolizados proteicos mediante hidrólisis enzimática.

La elección de la proteasa a emplear en el proceso hidrolítico es crucial, ya que el tipo de péptidos producidos y las características físicas, químicas, nutricionales, biológicas y tecno-funcionales del hidrolizado dependerán de la especificidad de la enzima. En este contexto, se ha observado que las proteasas que tienen menor especificidad dan lugar a un mayor rendimiento de oligopéptidos con actividad biológica que las proteasas con amplia especificidad (Gibbs y col., 2004). En la hidrólisis puede emplearse una única proteasa o diversas proteasas, ya sea simultáneamente, o secuencialmente. Actualmente existen disponibles muchas proteasas comerciales de grado alimentario, que pueden ser puras o bien preparaciones enzimáticas conteniendo diversas actividades (Aluko, 2015a). Estas enzimas comerciales derivan de microorganismos como por ejemplo Alcalasa, Savinasa, Flavourzyme y Protamex; de vegetales como la papaína; o tienen origen animal, como pepsina, tripsina y pancreatina (Samaranayaka y Li-Chan, 2011) algunos estudios han empleado preparaciones enzimáticas microbianas no comerciales para la obtención de hidrolizados proteicos con actividad biológica (Bougatef y col., 2010; Nasri y col., 2012; Balti y col., 2015), sugiriendo la potencial aplicación de nuevas fuentes de proteasas para la industria alimentaria. Atendiendo a su mecanismo de acción catalítica, las enzimas proteolíticas se pueden clasificar en endoproteasas y exoproteasas. Las endoproteasas hidrolizan enlaces peptídicos dentro de las proteínas para liberar péptidos de cadena relativamente larga, mientras que las exoproteasas eliminan aminoácidos terminales por hidrólisis de enlaces peptídicos localizados en los extremos N- o C-terminal. Para la obtención de hidrolizados proteicos con propiedades bioactivas es común el empleo de hidrólisis secuenciales con endo- y exoproteasas, ya que las primeras facilitan la acción de las segundas y permiten una hidrólisis superior (Clemente, 2000; Samaranayaka y Li-Chan, 2011) La relación enzima/sustrato es otro factor a tener en cuenta en la producción de hidrolizados proteicos ya que el rendimiento de la hidrólisis estará limitado cuando la concentración del sustrato es baja (Luna-Vital y col., 2015a).

El tiempo de hidrólisis es otro factor de gran importancia para la obtención de hidrolizados proteicos con las características nutricionales y bioactivas deseadas. Generalmente, el tiempo de hidrólisis está inversamente relacionado con el tamaño de los péptidos que constituyen el hidrolizado, que a su vez determina sus propiedades bioactivas, ya que péptidos de pequeño tamaño son los que presentan mayor bioactividad (Korhonen, 2009; Wada y Lönnnerdal, 2014). Sin embargo, en ocasiones se obtiene un plateau, después del cual aunque se prolongue el tiempo de hidrólisis no se modifican el tamaño de los péptidos obtenidos ni sus propiedades bioactivas (Betancur-Ancona y col., 2014; Aluko y col., 2015c)

Una vez finalizada la hidrólisis, las enzimas proteolíticas son inactivadas. El método de inactivación más empleado es el tratamiento térmico, ya que la mayoría de las enzimas se desnaturalizan cuando son sometidas a temperaturas superiores a 80 °C durante cortos periodos de tiempo (10-15 minutos) (Ariza-Ortega y col., 2014). La modificación brusca del pH es otro de los procedimientos comúnmente usados para inactivar las proteasas y finalizar la hidrólisis enzimática (Boschin y col., 2014b)

En base a la información expuesta, resulta evidente que la optimización de las condiciones de hidrólisis para cada enzima y sustrato proteico es indispensable con el fin de obtener un alto rendimiento de péptidos bioactivos, reduciendo los tiempos y los costes de producción.

3.6.2.2. Fermentación

La fermentación es un proceso natural de producción de hidrolizados proteicos en el que se aprovecha la actividad de los sistemas proteolíticos microbianos para hidrolizar proteínas alimentarias liberando péptidos y aminoácidos que los microorganismos emplean como fuente de nitrógeno para su crecimiento. Este método de producción de hidrolizados proteicos es especialmente relevante en el sector de los productos lácteos, si bien en los últimos años se está empleando también para la preparación de hidrolizados proteicos vegetales.

Para la producción de hidrolizados funcionales, la fermentación se lleva a cabo generalmente durante un periodo de tiempo comprendido entre varias horas y

varios días, dependiendo del sustrato proteico, del tipo de microorganismo y de las características deseadas en el hidrolizado (Aluko, 2015a).

Los microorganismos comúnmente empleados para la producción de hidrolizados proteicos a partir de proteínas alimentarias son las bacterias ácido lácticas (BAL), ya que presentan un sistema proteolítico complejo constituido por múltiples enzimas con diferentes especificidades (Savijoki y col., 2006; Liu y col., 2010). Las BAL presentan proteasas unidas a la pared celular responsables de iniciar la hidrólisis proteica produciendo oligopéptidos, así como sistemas de transporte específicos para internalizar los péptidos al citoplasma celular y diversas peptidasas intracelulares que hidrolizan los oligopéptidos a péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos (de Castro y Sato, 2015). Numerosos estudios en la bibliografía muestran la eficiencia del sistema proteolítico de bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* para la producción de hidrolizados proteicos bioactivos a partir de proteínas animales (Gobbetti y col., 2004; Fitzgerald y Murray, 2006; Nejati y col., 2013; Solieri y col., 2015) y vegetales (Martinez-Villaluenga y col., 2012; Lee y col., 2013; S Vallabha y Tikku, 2014). *Bacillus subtilis*, debido a su alta producción de proteasas extracelulares (Thuy y Bose, 2011), también ha sido utilizado con éxito para la obtención de hidrolizados proteicos con actividad biológica. Hay que señalar, además, que hongos filamentosos de los géneros *Rhizopus* y *Aspergillus* han sido tradicionalmente empleados para la obtención de productos vegetales conteniendo péptidos bioactivos (Gibbs y col., 2004; Fan y col., 2009; Nakahara y col., 2010; Giri y col., 2011)

3.6.2.3. Combinación de fermentación e hidrólisis enzimática

Una estrategia alternativa para la producción de hidrolizados proteicos a partir de proteínas alimentarias es la fermentación del sustrato proteico en combinación con el uso de una proteasa de grado alimentario. La acción combinada de enzimas bacterianas y proteasas comerciales no sólo incrementa el contenido de péptidos bioactivos del hidrolizado sino que, además, diversifica la bioactividad del mismo (Hafeez y col., 2014). Así, se ha demostrado que la fermentación de leche con BAL en combinación con

proteasas como Prozyme 6 y Flavourzyme, incrementa el rendimiento en péptidos bioactivos del hidrolizado lácteo y mejora su calidad sensorial con respecto a los obtenidos empleando bacterias fermentativas o proteasas comerciales separadamente (Chen y col., 2007; Tsai y col., 2008). Esta estrategia combinada es útil, además, cuando la BAL empleada no expresa proteasas en su pared celular, de modo que necesita una hidrólisis proteica previa por la proteasa comercial adicionada para poder hidrolizar los polipéptidos resultantes y utilizarlos como fuente de nitrógeno (Hafeez y col., 2014).

3.6.2.4. Procesos post-hidrolíticos

La hidrólisis enzimática, ya sea mediante enzimas proteolíticas de grado alimentario o fermentación, da lugar a la producción de un hidrolizado que contiene péptidos con un amplio rango de pesos moleculares, composición de aminoácidos y actividades biológicas. Por ello, los hidrolizados proteicos obtenidos, por lo general, no pueden ser directamente usados como ingrediente para la formulación de alimentos funcionales, sino que deben ser procesados tras la hidrólisis enzimática. Los procesos post-hidrolíticos más comunes están relacionados con el fraccionamiento de los péptidos resultantes y la reducción del sabor amargo del hidrolizado. El fraccionamiento permite la separación de los péptidos contenidos en el hidrolizado en grupos en función de su longitud, peso molecular, hidrofobicidad o carga neta (Aluko, 2015a). Generalmente se realiza mediante procesos de ultrafiltración a través de membrana, con el fin de eliminar proteínas residuales y péptidos de alto peso molecular y obtener productos con el peso molecular deseado (Clemente, 2000; Samaranayaka y Li-Chan, 2011) Este método ofrece la posibilidad de fraccionar los péptidos en una amplia gama de pesos moleculares empleándose membranas por lo general de 1, 3, 5 y 10 kDa. En la producción a gran escala de hidrolizados proteicos la hidrólisis enzimática está acoplada a un sistema de ultrafiltración, por lo que las proteasas son retenidas en la membrana, reduciéndose así los costes relacionados con la inactivación de las proteasas mediante tratamiento térmico (Clemente, 2000; Samaranayaka y Li-

Chan, 2011) Otras técnicas como la nanofiltración, las membranas de intercambio iónico o la cromatografía líquida en fase reversa son comúnmente empleadas para la concentración y separación de los péptidos de peso molecular deseado (Najafian y Babji, 2012). Una vez fraccionados, la identificación de los péptidos contenidos en cada fracción se realiza generalmente mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

Uno de los inconvenientes del empleo de los hidrolizados proteicos como ingredientes es su sabor desagradable debido al sabor amargo derivado de los péptidos con gran proporción de aminoácidos hidrofóbicos (Schaafsma, 2009). La eliminación de estos aminoácidos por la adición de exopeptidasas elimina el amargor y mejora el sabor de los hidrolizados (Pedersen, 1994).

Los hidrolizados obtenidos mediante fermentación requieren de un procesado previo al fraccionamiento e identificación de los péptidos, ya que es necesario separar los péptidos de los microorganismos fermentativos. En el caso de las fermentaciones líquidas, los hidrolizados se filtran y, en ocasiones, se liofilizan, mientras que en el caso de las fermentaciones sólidas hay que realizar una extracción de los péptidos en fase acuosa antes de centrifugar (Inoue y col., 2009).

3.6.3. Aplicación de altas presiones hidrostáticas para la producción de péptidos bioactivos

Los tratamientos de altas presiones hidrostáticas (APH) consisten en someter a un alimento, previamente sellado a vacío, a altos niveles de presión hidrostática (transmitida por el agua) entre 10 y 1000 MPa, durante un corto periodo de tiempo. La presión aplicada se distribuye de manera instantánea y uniforme en todos los puntos del alimento, independientemente de su geometría y del tamaño del equipo (Torres y Velazquez, 2005; Li y col., 2011b), por lo que el alimento mantiene su forma original (San Martín y col., 2002). Además, el equipo suele estar unido a un sistema de termostatación que permite realizar tratamientos combinados de presión y temperatura.

La utilización de las APH para modular las reacciones enzimáticas se presenta como un campo prometedor aunque esporádicamente explorado hasta el momento. En el caso concreto de reacciones de hidrólisis de proteínas alimentarias, se ha observado que el tratamiento de APH mejora el rendimiento hidrolítico de las enzimas empleadas (Lopez-Exposito y col., 2008; Hoppe y col., 2013; Kim y col., 2015). Este efecto se debe al aumento de la actividad catalítica de las enzimas, al favorecimiento de la interacción enzima-sustrato, así como a cambios en la conformación de la proteína sustrato (Oey y col., 2008).

La actividad catalítica de las enzimas puede verse mejorada por la APH si el volumen de activación que está asociado a la reacción es negativo (principio de Le Chatelier) (Luong y Winter, 2015). Por otro lado, las APH aumentan la flexibilidad conformacional de las proteínas y, por tanto, puede mejorarse la tasa de reacción, ya que se requiere la flexibilidad conformacional para la activación de las enzimas. En base al principio termodinámico de Le Chatelier, las APH puede también alterar la especificidad de una enzima por el sustrato favoreciendo la conversión de éste a un producto con un volumen más pequeño. En este sentido, se ha descrito que la actividad enzimática de la α -quimotripsina a 470 MPa es 6.5 veces mayor que a presión atmosférica (Aertsen y col., 2009). Este efecto ha sido también observado en la termolisina, aumentando su actividad 45 veces a 200 MPa comparado con su actividad a presión atmosférica (Kunugi y col., 1997).

Como consecuencia del tratamiento de APH, se producen cambios conformacionales en las proteínas aumentando su susceptibilidad a la hidrólisis. Se ha descrito que presiones menores a 200 MPa provocan la disociación de proteínas oligoméricas, el desdoblamiento de la estructura proteica, así como la exposición de nuevos sitios de escisión. La estructura secundaria de las proteínas puede llegar a sufrir un ligero grado de desdoblamiento que favorece la exposición de regiones hidrofóbicas susceptibles de ser hidrolizadas (Torres y Velazquez, 2005). Por otro lado, la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas se ve modificada por la APH

en mayor medida debido a la ruptura de enlaces de hidrógeno y puentes disulfuro y a la desestabilización de interacciones hidrofóbicas intra- e intermoleculares, lo que favorece la exposición de nuevos sitios de escisión (Boonyaratanakornkit y col., 2002). Cabe destacar que la magnitud de los cambios conformacionales y, por tanto, el grado de hidrólisis de las proteínas provocados por el tratamiento de APH dependen de muchos factores como el tipo de proteína, la enzima, las condiciones del proceso (pH, tiempo y temperatura) y la presión aplicada.

Numerosos estudios demuestran el gran atractivo que presenta la hidrólisis proteica bajo APH en la producción de hidrolizados proteicos con propiedades hipoalergénicas. Se ha descrito que el tratamiento enzimático bajo APH aumenta el rendimiento hidrolítico de proteínas de leche (Peñas y col., 2006a; Chicón y col., 2008), soja (Peñas y col., 2006b; Peñas y col., 2006c) y huevo (Lopez-Exposito y col., 2008), a la vez que conduce a una importante reducción de su antigenicidad, sin la necesidad de hacer una hidrólisis extensiva.

Otros estudios han revelado la utilidad de la hidrólisis enzimática de proteínas asistida por APH en la producción de hidrolizados funcionales. Zhang y col., (2012) observaron que concentrados proteicos de garbanzo digeridos por Alcalasa a presiones de 200 MPa durante 20 minutos presentaban una mayor capacidad para atrapar O_2^- que cuando la hidrólisis se producía a presión atmosférica (Zhang y col., 2012). De forma similar, hidrolizados de cacahuete obtenidos bajo APH presentaron mayor actividad para atrapar radicales hidroxilo y mayor poder reductor que aquellos hidrolizados que no se sometieron a APH (Dong y col., 2011). Por otro lado, se ha demostrado la utilidad de la APH para la obtención de hidrolizados con propiedades antihipertensivas. Chao y col. (2013) observaron que tras hidrolizar con Alcalasa concentrados proteicos de guisante bajo alta presión se producían péptidos con potente actividad para inhibir la ECA y la renina. La hidrólisis bajo APH de proteínas de huevo aumenta la actividad antioxidante y antihipertensiva de los hidrolizados en comparación a los hidrolizados obtenidos a presión atmosférica (Quirós y col., 2007; Hoppe y col., 2013).

Resultados

4. Resultados

En el siguiente capítulo se muestran los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral en base a los objetivos propuestos. Estos resultados se recogen en 5 artículos de investigación, 3 de ellos publicados y 2 en fase de revisión, en revistas científicas incluidas en el Science Citation Index (SCI).

4.1. Producción y caracterización de hidrolizados multifuncionales a partir de leguminosas mediante hidrólisis con proteasas de grado alimentario.

La OMS señala la importancia de mejorar los hábitos nutricionales de la población con el fin de evitar el aumento de la incidencia de la hipertensión en los próximos años (Nichols, 2012). En este sentido, numerosos estudios realizados en los últimos años se han centrado en la producción de alimentos funcionales que contribuyan a reducir la presión sanguínea. Sin embargo, debido a la gran rigidez de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) para aprobar alegaciones de salud en los alimentos, son muy pocos los alimentos disponibles en el mercado Europeo destinados a reducir la tensión arterial. Se trata, principalmente, de productos lácteos fermentados, cuyo consumo regular ha demostrado ser eficiente para reducir moderadamente la presión sanguínea. Sin embargo, no existen, alimentos funcionales antihipertensivos derivados de leguminosas, vegetales cuyo consumo frecuente se ha relacionado con una disminución de la presión sanguínea (Fekete y col., 2015).

Dada la baja diversidad en el mercado de alimentos antihipertensivos unido a la demanda creciente por parte de los consumidores de alimentos con propiedades beneficiosas para la salud, consideramos interesante obtener hidrolizados a partir de proteínas de leguminosas con actividades antioxidante e inhibidora de la ECA que puedan actuar sobre distintas dianas moleculares y celulares (estrés oxidativo, SRAA) implicadas en la hipertensión. Estos hidrolizados podrían emplearse en la elaboración de nuevos alimentos funcionales destinados a reducir la tensión arterial. Hasta el momento solo unos pocos estudios científicos se han centrado en la obtención de péptidos

antioxidantes y antihipertensivos a partir de leguminosas. No obstante, hasta la fecha de realización de este trabajo, no teníamos constancia de ningún estudio científico encaminado a la obtención de hidrolizados proteicos multifuncionales a partir de lenteja y judía. Este trabajo se ha centrado en ambas leguminosas por su elevado consumo a nivel mundial (Broughton y col., 2003), así como por su alto contenido en proteínas, fuentes potenciales de péptidos bioactivos (López-Barrios y col., 2014), y de compuestos fenólicos, cuya ingesta se ha asociado a la reducción de la presión arterial (Yao y col., 2012; Al Shukor y col., 2013). Para obtener altos rendimientos en la producción de péptidos bioactivos es importante la selección de enzimas proteolíticas con especificidades que permitan la liberación de fragmentos activos a partir de las proteínas precursoras. En consecuencia, nos planteamos evaluar la efectividad de diversas proteasas de grado alimentario para la producción de hidrolizados proteicos con actividades antioxidante e inhibidora de la ECA a partir de concentrados proteicos de lenteja (Publicación I). La identificación de péptidos bioactivos derivados de las proteínas de leguminosas aún es incipiente y está limitada a unos pocos estudios, por tanto, se llevó a cabo la caracterización de la fracción < 3 kDa de los hidrolizados de lenteja más activos para identificar péptidos con actividades antioxidante e inhibidora de la ECA, establecer relaciones estructura-actividad y evaluar la estabilidad de su bioactividad a la digestión gastrointestinal (Publicación II). Por último, dado que las leguminosas son fuente de compuestos fenólicos, se planteó estudiar el efecto de la hidrólisis enzimática en la liberación simultánea de péptidos bioactivos y compuestos fenólicos y conocer la contribución de ambos compuestos en la actividad antioxidante, inhibidora de la ECA y anti-inflamatoria de hidrolizados proteicos de judía pinta (Publicación III). A continuación, se presentan los resultados obtenidos en estos estudios recogidos en forma de tres publicaciones:

Publicación I. Savinasa, la enzima más efectiva para liberar péptidos con propiedades multifuncionales a partir de concentrados proteicos de lenteja (*Lens culinaris* var. castellana).

Publicación II. Identificación, estabilidad gastrointestinal y docking molecular de péptidos de lenteja con actividades antioxidante e inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I.

Publicación III. Liberación simultánea de compuestos fenólicos y péptidos con actividad antioxidante, inhibidora de la IECA y anti-inflamatoria a partir de proteínas de judía (*Phaseolus vulgaris* L. var. pinto) mediante el empleo de subtilisinas.

Publicación I. Savinasa, la enzima más efectiva para liberar péptidos con propiedades multifuncionales a partir de concentrados proteicos de lenteja (*Lens culinaris* var. castellana).

Patricia García-Mora, Elena Peñas, Juana Frías, Cristina Martínez-Villaluenga. Savinase, the most suitable enzyme for releasing peptides from lentil (*Lens culinaris* var. castellana) protein concentrates with multifunctional properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62: 4166-4174.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue producir hidrolizados multifuncionales a partir de concentrados proteicos de lenteja. Para ello, se evaluó la eficacia hidrolítica de cuatro proteasas de grado alimentario (Alcalasa, Savinasa, Protamex y Corolasa 7089) durante diversos tiempos de hidrólisis sobre las proteínas de lenteja, así como su viabilidad para la obtención de hidrolizados proteicos con actividades inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I (IECA) y antioxidante. Las enzimas Alcalasa y Savinasa mostraron mayor eficiencia proteolítica ($P \leq 0.05$) sobre las proteínas de lenteja, causando la mayor formación de péptidos < 3 kDa. El hidrolizado producido por la enzima Savinasa tras 2 h de hidrólisis (S2) exhibió las mayores actividades IECA ($IC_{50} = 0,18$ mg/mL) y antioxidante (1,22 μ mol Trolox equivalentes/mg de proteína). El hidrolizado S2 se ultrafiltró a través de una membrana de 3 kDa y la composición del permeado obtenido se analizó mediante HPLC acoplada a espectrometría de masas en tándem. Los resultados indicaron que la fracción S2 contenía 32 péptidos procedentes, principalmente, de las proteínas convicilina, vicilina y legumina, que contenían secuencias de aminoácidos bioactivas, potencialmente responsables de las actividades IECA y antioxidante observadas en estos hidrolizados de lenteja. El hidrolizado S2 se sometió a un proceso de digestión gastrointestinal simulada con pepsina y pancreatina, encontrándose una mejora significativa ($P \leq 0.05$) de las actividades IECA y antioxidante del hidrolizado tras este proceso. Los hidrolizados de lenteja multifuncionales obtenidos en este estudio podrían fomentar el empleo de las proteínas de lenteja para la formulación de alimentos funcionales y nutracéuticos.

Savinase, the Most Suitable Enzyme for Releasing Peptides from Lentil (*Lens culinaris* var. *Castellana*) Protein Concentrates with Multifunctional Properties

Patricia Garcia-Mora, Elena Peñas, Juana Frias, and Cristina Martínez-Villaluenga*

Department of Food Characterization, Quality and Safety, Institute of Food Science, Technology and Nutrition, Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

ABSTRACT: The aim of this study was to produce multifunctional hydrolysates from lentil protein concentrates. Four different proteases (Alcalase, Savinase, Protamex, and Corolase 7089) and different hydrolysis times were evaluated for their degree and pattern of proteolysis and their angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory and antioxidant activities. Alcalase and Savinase showed the highest proteolytic effectiveness ($P \leq 0.05$), which resulted in higher yield of peptides. The hydrolysate produced by Savinase after 2 h of hydrolysis (S2) displayed the highest ACE-inhibitory ($IC_{50} = 0.18$ mg/mL) and antioxidant activity (1.22 μ mol of Trolox equiv/mg of protein). Subsequent reverse-phase HPLC–tandem mass spectrometric analysis of 3 kDa permeates of S2 showed 32 peptides, mainly derived from convicilin, vicilin, and legumin containing bioactive amino acid sequences, which makes them potential contributors to ACE-inhibitory and antioxidant activities detected. The ACE-inhibitory and antioxidant activities of S2 were significantly improved after in vitro gastrointestinal digestion ($P \leq 0.05$). Multifunctional hydrolysates could encourage value-added utilization of lentil proteins for the formulation of functional foods and nutraceuticals.

KEYWORDS: lentil protein hydrolysates, alkaline proteases, antioxidant peptides, ACE-inhibitory peptides

■ INTRODUCTION

Hypertension is a public health problem associated with cardiovascular complications affecting 25% adult population worldwide.¹ Moreover, the increasing number of individuals with metabolic syndrome is contributing to the rising prevalence of hypertension. In view of its high prevalence, pharmacotherapy and diet and lifestyle modifications are applied for treatment of hypertension. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme (ACE; EC 3.4.15.1) has been used as a target therapy for treatment of hypertension.² This enzyme plays a crucial role in the renin–angiotensin and kinin–kallikrein systems regulating blood pressure.³ Inhibition of ACE reduces the concentration of angiotensin II, a vasoconstrictor octapeptide, while it increases levels of the vasodilator peptide bradykinin, which results in the lowering of blood pressure.²

A recent study has shown increased participation of reactive oxygen species and reduced antioxidant enzymatic defense in the pathogenesis of hypertension.⁴ Oxidative stress affects several cellular signaling cascades and cellular functions,⁵ reducing the bioavailability of nitric oxide, a vasodilatory molecule involved in smooth muscle relaxation in the cardiovascular system.⁶ In addition, oxidation of membrane lipids brings about lipid peroxidation products, which damage proteins in the cardiovascular system.⁷ Therefore, amelioration of oxidative stress in addition to inhibition of ACE provides a multitarget therapy that may improve the clinical efficacy of pharmacological treatments for management of hypertension and other cardiovascular disorders.

Because of the adverse side effects of synthetic drugs, functional foods containing natural compounds are alternative strategies to drug therapy.⁸ Food-derived bioactive peptides with more than one bioactivity have multifunctional properties that can potentially be useful in targeting the multiple

pathophysiological conditions underlying hypertension.⁹ Much research has been focused on the generation of peptides derived from animal and plant food proteins for the management of hypertension.¹⁰ To date, milk is the main source of ACE-inhibitory peptides, in addition to egg, meat, and fish.¹¹ However, plant sources have gained less attention in this respect.

Lentil is a traditional pulse crop providing economic benefits in addition to the benefits derived from crop rotation, nitrogen fixation, and sustainable agriculture.¹² Lentils are a staple food in many countries, providing an inexpensive source of protein in the diet (20–30%); however, they are largely underexploited for new emerging applications in the functional foods and nutraceutical areas. Previous studies have shown the potential of lentil proteins as source of ACE-inhibitory peptides.^{13,14} In contrast, no studies have been conducted to produce multifunctional hydrolysates from lentil proteins exhibiting both ACE-inhibitory and antioxidant activities so far, which would open up new possibilities for value-added applications of lentil.

Bioactive peptides may be produced by enzymatic hydrolysis of food proteins with enzymes of microbial, plant, or gastrointestinal origin. Several enzymes have been used to produce lentil hydrolysates with bioactive properties such as Alcalase + Flavourzyme, bromelain, papain, and gastrointestinal enzymes.^{13,14} These studies have shown that ACE-inhibitory activity of lentil hydrolysates strongly depends on protease specificity. Moreover, the release of bioactive peptides and,

Received: February 18, 2014

Revised: April 15, 2014

Accepted: April 16, 2014

Published: April 16, 2014

consequently, the biological activity of protein hydrolysates can be affected by operational conditions such as hydrolysis time.¹⁵ The objective of this work was to produce multifunctional lentil hydrolysates with ACE-inhibitory and antioxidant peptides. The effect of protease type and hydrolysis time on the proteolytic pattern and ACE-inhibitory and antioxidant activities of lentil hydrolysates was also studied. This information is critical for the development of value-added products, particularly as ingredients for the functional food and nutraceutical markets.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Lentil seeds (*Lens culinaris* var. Castellana) were provided by Semillas Iglesias S.A. (Salamanca, Spain) and stored in polyethylene bins at 4 °C. Commercial food-grade enzymes Alcalase 2.4L FG, Savinase, and Protamex were kindly provided by Novozymes (Bagsvaerd, Denmark). Alcalase and Savinase are alkaline serine proteases from *Bacillus licheniformis* and *Bacillus* sp., respectively. Protamex is a *Bacillus* protease complex consisting of subtilisin and neutral protease (EC 3.4.24.28). Corolase 7089 is a fungal neutral protease provided by AB Enzymes GmbH (Darmstadt, Germany). Tripeptide Abz-Gly-Phe(NO₂)-Pro was purchased from Cymit-Quimica (Barcelona, Spain). All other chemicals were purchased from Sigma–Aldrich Quimica (Madrid, Spain) unless otherwise specified.

Preparation of Lentil Protein Concentrates. Whole lentil seeds were ground in a coffee mill (Moulinex, Allencçon, France) and passed through a 60-mesh sieve and 0.5 mm pore size. The lentil powders were stored at –20 °C before use. Total protein concentration in lentil flour was determined as total nitrogen multiplied by 6.25. Total nitrogen of lentil flours was analyzed in duplicate on a Leco Trumac apparatus (Leco Corp., St. Joseph, MI).

Lentil protein concentrates were prepared by alkaline extraction. Briefly, lentil flour was suspended in water (solid-to-solvent ratio 1:10 w/v) and the pH value was adjusted to 8. The suspension was stirred in an orbital shaker (Infors, Switzerland) at 20 °C for 1 h and then vacuum-filtered through a filter funnel (100–160 μm nominal pore size) to remove solids. Finally, filtrates were freeze-dried and stored under vacuum and dark conditions in plastic bags at –20 °C until further analysis. The soluble protein concentration in the filtrates was determined by the DC protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) following the manufacturer's protocol. Bovine serum albumin (BSA) was used as standard at a concentration range from 0 to 1 mg/mL.

Enzymatic Proteolysis. Freeze-dried lentil protein concentrates were suspended in deionized water (2% w/v) and equilibrated at 40 °C, and the pH value was adjusted to 8 with 0.1 M NaOH. Enzymatic proteolysis was carried out at an enzyme to substrate ratio (E/S) of 0.1 AU/mg of soluble protein at 40 °C and pH 8. Aliquots were withdrawn at 0, 1, 2, 3, 4, 5, and 6 h from reaction mixtures and heated at 80 °C for 15 min for enzyme inactivation. Finally, hydrolysates were centrifuged at 23430g at 10 °C for 10 min, freeze-dried, and stored at –20 °C until use. Protein concentration was determined by the DC protein assay (Bio-Rad). Samples were coded for protease type (A = Alcalase, S = Savinase, P = Protamex, and C = Corolase 7089) followed by hydrolysis time (1, 2, 3, 4, 5, and 6). For example, S2 hydrolysates are those produced from lentil concentrate hydrolyzed by Savinase for 2 h. Hydrolysis were performed at least in triplicate for each enzyme.

Degree of Hydrolysis. The degree of hydrolysis (DH) was calculated by determination of free amino groups by reaction with 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid according to Adler-Nissen.¹⁶ Total number of amino groups in lentil protein concentrate was determined after acid hydrolysis in 6 N HCl at 110 °C for 24 h in vials sealed under nitrogen. Analyses were performed in duplicate. Degree of hydrolysis (percentage) was calculated from the following equation:

$$DH = 100 \times [(AN_2 - AN_1)/N_{pb}]$$

where AN₁ is amino nitrogen content in the protein substrate before hydrolysis, AN₂ is amino nitrogen content in the free protein after hydrolysis, and N_{pb} is the total amino groups in the protein substrate (all expressed as milligrams of tyrosine equivalents/gram of protein) as determined with 6 N HCl at 110 °C for 24 h.

Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis. SDS–PAGE analysis of the protein hydrolysates was performed on NuPAGE Novex 4–12% Bis-Tris gels in the XCell-sure lock mini-cell system (Invitrogen, Madrid, Spain). Electrophoresis was carried out at 200 V. NuPAGE MES-SDS and NuPAGE LDS were used as running and sample buffers (Invitrogen), respectively. Runs were carried out under nonreducing conditions in which 2-mercaptoethanol was omitted in the denaturing buffer. Electrophoretic bands were stained with SimplyBlue SafeStain (Invitrogen), followed by destaining in deionized water. The molecular weights of poly- and oligopeptides were determined by comparison with the molecular weight marker solution Mark 12 (Invitrogen).

ACE-inhibitory Activity. ACE-inhibitory activity of samples was measured in duplicate following the fluorescence-based protocol of Sentandreu and Toldrá.¹⁷ The generated fluorescence was read every minute for 30 min at emission and excitation wavelengths of 355 and 405 nm, respectively, in a microplate fluorometer, Synergy HT (Biotek, Winooski, VT). IC₅₀ values, expressed in protein concentration (milligrams per milliliter), were calculated for the most active hydrolysates. IC₅₀ was determined by dose–response curves in which the range of protein concentration (0–0.5 mg/mL) was distributed in a logarithmic scale and by use of the nonlinear regression sigmoidal curve-fit function in GraphPad Prism 4.00 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA). Protein concentration of 3 kDa permeates was measured by DC protein assay (Bio-Rad).

Oxygen Radical Absorbance Capacity. ORAC of samples was measured in duplicate by fluorescence as described previously.¹⁸ Results were expressed as micromoles of Trolox equivalents (TE) per milligram of protein.

Proteomic Analyses. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) analysis was performed for the most active hydrolysates. Peptide mass fingerprint was performed on a Voyager-DE Pro mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA) equipped with a pulsed 337 nm nitrogen laser (1 ns pulse width and 3 Hz frequency), which was operated in the reflector mode for positive ions. Parameters of the instrument were as follows: acceleration voltage of 20 kV, an extraction voltage of ions generated by laser desorption was introduced into a time-of-flight analyzer (1.3 m flight path) with an acceleration voltage of 20 kV, 76% grid voltage, 0.001% ion guide wire voltage, and delayed extraction time of 400 ns. The samples were mixed with the matrix at a ratio of 1:5 (v/v), and 1 μL of this solution was spotted onto a flat stainless-steel sample plate and dried in air. Mass spectra were obtained over the *m/z* range 500–4000. External mass calibration was applied by use of the monoisotopic [M + H]⁺ values of des-Arg¹-bradykinin, angiotensin I, insulin, Glu¹-fibrinopeptide B, and adrenocorticotropic hormone fragments 1–17, 18–39, and 7–38.

For peptide identification, 10 μg of the most active hydrolysate was desalted by reverse-phase (PorosR2) chromatography with 80% acetonitrile (ACN)/0.1% trifluoroacetic acid (TFA). Later, the peptides were dried and resuspended in 10 μL of 0.1% TFA. An aliquot of 5 μL of resuspended sample was injected into the linear trap quadrupole (LTQ) Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Peptides were loaded onto a C18-A1 ASY-column 2 cm precolumn (Thermo Scientific) and then eluted onto a Biosphere C18 column (C18, inner diameter 75 μm, 15 cm long, 3 μm particle size) (NanoSeparations) at a flow rate of 250 nL/min on a nanoEasy high-performance liquid chromatography (HPLC) instrument (Proxeon) coupled to a nanoelectrospray ion source (Proxeon).

The mobile phases used consisted of 0.1% formic acid/2% ACN (solvent A) and 0.1% formic acid in 100% ACN (solvent B). The solvent gradient was from 100% A to 35% B in 140 min. Mass spectra were acquired in the positive-ion mode. Full-scan MS spectra (*m/z* 400–1800) were acquired with a target value of 1 000 000 at a resolution of 30 000 at *m/z* 400, and the 15 most intense ions were

selected for collision-induced dissociation fragmentation in the LTQ with a target value of 10 000 and normalized collision energy of 38%. Precursor ion charge-state screening and monoisotopic precursor selection were enabled. Singly charged ions and unassigned charge states were rejected. Dynamic exclusion was enabled with a repeat count of 1 and exclusion duration of 30 s.

Proteome Discoverer 1.4.288 (Thermo) with MASCOT 2.3 was used to search in NCBI database, taxonomy Viridiplantae (1 530 236 sequences) and a homemade database with the *Lens culinaris* entries in UniProt (336 sequences, 75 114 residues). Database search parameters used were the following: peptide tolerance, 10 ppm; fragment ion tolerance, 0.8 Da; no enzyme and variable modification, methionine oxidation. In all peptide identification, the probability scores were greater than the score fixed by Mascot as significant with a *p*-value minor than 0.05. The automatic decoy database search function of Protein Discover was enabled to allow estimation of false discovery rate (FDR). Sequence identification with reported biological activity was compared with bioactive peptide sequences submitted to the BIOPEP database (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>).

In Vitro Gastrointestinal Digestion. Lentil hydrolysates produced by selected protease type and hydrolysis time were further subjected to simulated gastrointestinal digestion by sequential hydrolysis with pepsin and pancreatin.¹⁹ Digestions were stopped by heating samples in boiling water for 10 min. Samples were stored at -20°C and then freeze-dried. Protein content was determined for each sample by the DC protein assay (Bio-Rad).

Statistical Analysis. Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) by Statgraphics Centurion XVI software, version 16.1.17 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD). Differences between samples were compared by Duncan's multiple-range test at $P \leq 0.05$ probability levels.

RESULTS AND DISCUSSION

Protein content of lentil flour ($27.4\% \pm 0.1\%$ on dry basis) was within the range of reported values for lentil flours.²⁰ Alkaline extraction at pH 8 led to 80% extraction of total protein. Thus, protein content of lentil var. Castellana protein concentrate was $75.54\% \pm 0.2\%$ on dry basis, which was comparable to previous data for red and green lentil protein concentrates ($78.2\% \pm 0.2\%$ and $79.1\% \pm 0.3\%$).²¹ The obtained lentil protein concentrate was hydrolyzed by different enzymes (Alcalase, Savinase, Protamex, and Corolase 7089) to determine the most effective one for hydrolyzing lentil proteins and releasing ACE-inhibitory and antioxidant peptides.

Proteolytic Pattern of Hydrolysis. To evaluate hydrolysis efficiency, the degree of hydrolysis (DH) value is a widely used criterion, as it is highly related to the hydrolytic process yield. Figure 1 shows the effect of protease type and hydrolysis time in the DH of lentil proteins. DH values increased gradually, reaching a plateau at 5 h for Alcalase, Savinase, and Protamex (23%, 15%, and 11%) and at 4 h for Corolase 7089 (10%). The significant differences ($P \leq 0.05$) found among DH values of lentil hydrolysates may be attributed to different enzyme specificity.²² Subtilisins have a broad specificity, which explains the higher proteolytic efficiency of Alcalase and Savinase compared to Protamex and Corolase 7089. Our results agree with previous studies showing the ability of Alcalase to produce protein hydrolysates with higher DH than other enzymes.²³ Maximum DH observed in the present study for Alcalase hydrolysates (23%) is comparable to values reported in earlier studies for other legume proteins.^{24,25} In contrast, the degree of hydrolysis of cowpea and bean proteins by Alcalase was found to be significantly different from that of lentil proteins (35.7% and 14%, respectively).^{26,27} These differences in the susceptibility of lentil proteins to hydrolysis might be attributed

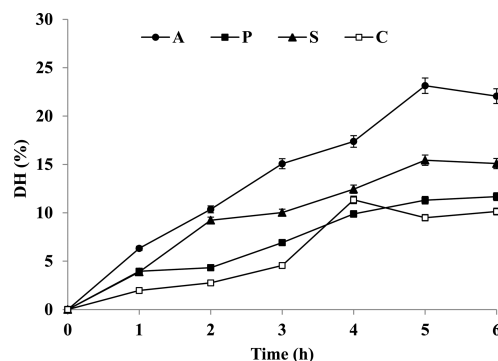


Figure 1. Degree of hydrolysis (DH) of lentil proteins for different proteases and hydrolysis times. The experiments were performed in duplicate. Bars indicate standard deviation. A, Alcalase; S, Savinase; P, Protamex; C, Corolase 7089.

to their particular structure.²⁸ Enzymatic treatments with sequential addition of Alcalase (1 h) and Flavourzyme (1.5 h) have also been used to increase proteolytic efficiency in the production of lentil hydrolysates.²⁹ In this case, high DH values were obtained (58% and 64% for red and green lentil proteins, respectively); however, extensive proteolysis is not recommended because peptides generated may produce bitterness and worsen important technological properties required for particular food industry applications.

Figure 2 shows the electrophoretic profiles of lentil hydrolysates produced by (A) Alcalase, (B) Savinase, (C) Protamex, and (D) Corolase 7089. Nonhydrolyzed protein concentrate (Figure 2, lanes 2) showed nine intense bands with apparent molecular masses (MM) from 14.4 to 95 kDa. The major bands found in lentil concentrate had estimated MM of 50 and 65 kDa, which probably correspond to subunits of vicilin (48 kDa) and convicilin (63 kDa), respectively.³⁰ Other bands with lower MM of 40, 20, and <15 kDa were considered to belong to 11S acidic subunit, 11S basic subunit, and a mixture of γ -vicilin and albumin polypeptides, respectively.³¹ The electrophoretic profile of protein concentrates from lentil var. Castellana was similar to that reported for green and red lentil concentrates.¹³ Major polypeptides found in lentil protein concentrate were readily hydrolyzed by Alcalase to small peptides <10 kDa after 1 h (Figure 2A, lane 3). Longer hydrolysis times from 4 to 6 h induced further breakdown of peptide bonds and formation of much smaller fractions at MM < 6 kDa (Figure 2A, lanes 6–8). Our results agree with previous studies in which Alcalase digestion was efficient in producing small peptides with MM below 10 kDa from chickpea²⁴ and bean^{26,31} proteins. In addition, sequential use of Alcalase and Flavorzyme to produce peptides from lentil proteins has been proven more effective than the use of gastrointestinal enzymes, papain, and bromelain.¹³ Similarly to Alcalase, protein digestion by Savinase was also efficient. A sharp reduction of most polypeptides (30, 40, 50, 55, and 65 kDa) present in lentil protein concentrate was observed after 1 h of hydrolysis, appearing as new bands under 14 kDa (Figure 2B, lane 3). As hydrolysis progressed, polypeptides with estimated MM of 50, 55, and 65 kDa were completely degraded (Figure 2B, lanes 4–8). In addition, the reduction of intensity of bands with MM <14 kDa suggested further degradation of the peptides into much smaller fragments. In contrast, Protamex and Corolase 7089 digestions were not as

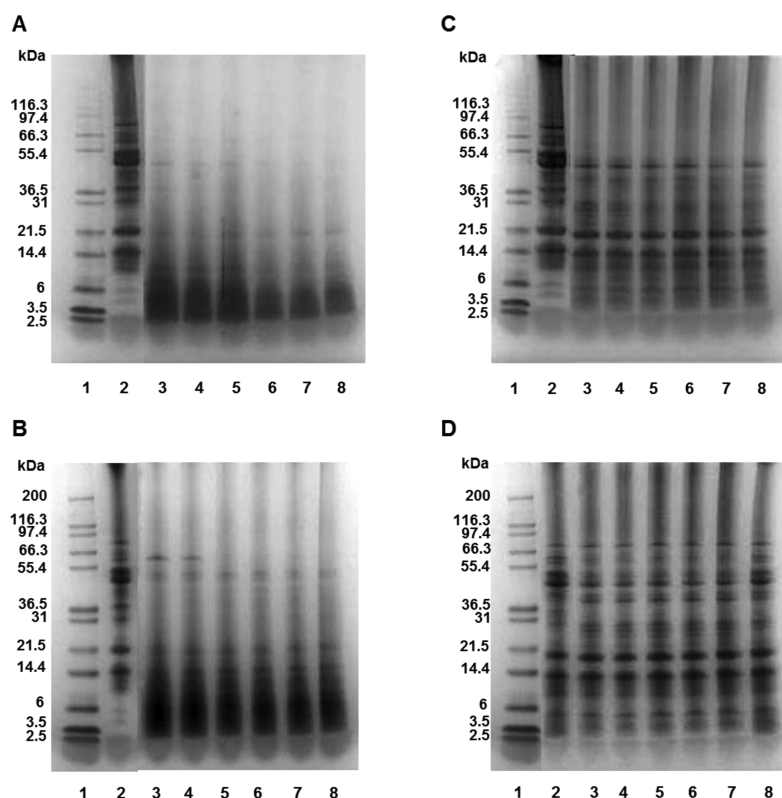


Figure 2. Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) profiles of lentil hydrolysates obtained for different proteases and hydrolysis times. (A) Alcalase; (B) Savinase; (C) Protamex; (D) Corolase 7089 hydrolysates. Lane 1, molecular weight marker Mark 12; lanes 2–8, respectively 0, 1, 2, 3, 4, 5, and 6 h of hydrolysis.

efficient as Alcalase and Savinase digestions, consistent with DH values (Figure 2C,D). Protamex digestion completely degraded high- and medium-molecular weight polypeptides (estimated MM 30, 37, 60, 67, and 90 kDa) within 1 h (Figure 2C, lane 3). As a consequence, the appearance of some bands between 30 and 20 kDa and <10 kDa was observed. Further treatment with Protamex resulted in slight changes in the digest profile, such as the disappearance of some bands with apparent MM between 30 and 20 kDa, and increased intensity of the fraction <10 kDa (Figure 2C, lanes 4–8). Finally, Corolase 7089 treatment decreased the intensity of bands with MM 50, 55, 67 kDa, while the appearance of lower MM bands at 25 and 28 kDa and under 6 kDa were observed after 1 h (Figure 2D, lane 3). Longer digestion time had little impact on the SDS–PAGE profiles, in which only the increased intensity in the fraction under 6 kDa was observed (Figure 2D, lanes 4–8). Resistance of lentil and other legume proteins to proteases such as Protamex and Corolase 7089 has not been reported previously.

ACE Inhibitory Activity of Lentil Protein Hydrolysates.

ACE-inhibitory peptides are generally short amino acid sequences, since the active site of ACE cannot accommodate large peptide molecules.³² Therefore, samples were ultrafiltered through a 3 kDa cutoff membrane and the permeate was used for ACE-inhibitory analysis. Nonhydrolyzed lentil protein concentrate showed weak ACE-inhibitory activity (20% inhibition). ACE-inhibitory activity of hydrolysates was significantly affected by the protease used and the hydrolysis

time (Table 1). Alcalase and Savinase hydrolysates exhibited higher ACE inhibition (64–71% and 56–63%, respectively) than Protamex (31–46%) and Corolase 7089 (28–50%)

Table 1. Effect of Hydrolysis Time and Protease Type on ACE-Inhibitory Activity of Lentil Hydrolysates^a

time (h)	ACE inhibition (%)			
	A	S	P	C
0	20.34 ± 1.48 A a	20.49 ± 0.53 A a	21.20 ± 4.02 A a	20.17 ± 0.1 A a
1	64.37 ± 1.57 B c	56.73 ± 1.54 B b	46.52 ± 3.84 D a	41.51 ± 0.12 D a
2	64.37 ± 0.25 B c	63.35 ± 2.41 C c	41.04 ± 1.17 CD a	50.57 ± 5.45 E b
3	71.65 ± 0.74 D c	59.08 ± 0.42 B b	38.10 ± 1.90 C a	36.79 ± 2.28 CD a
4	70.37 ± 2.93 D c	59.08 ± 1.61 B b	40.50 ± 1.42 C a	36.23 ± 4.42 CD a
5	68.00 ± 2.36 CD c	57.41 ± 2.08 B b	31.86 ± 1.11 B a	33.19 ± 3.46 BC a
6	67.74 ± 1.98 BC c	56.33 ± 2.23 B b	31.23 ± 0.04 B a	28.37 ± 1.19 B a

^aData indicate mean value ± standard deviation of two independent experiments. Different uppercase letters within a column are significantly different ($P < 0.05$, Duncan's test). Different lowercase letters within a row are significantly different ($P < 0.05$, Duncan's test). A, Alcalase; S, Savinase; P, Protamex; C, Corolase 7089. Protein concentration of samples in the ACE inhibition assay was 0.5 mg/mL.

digests, regardless of hydrolysis time. ACE-inhibitory efficacy is directly associated with chain length and peptide sequence. Short peptide chains containing between 3 and 12 amino acid residues and Tyr, Phe and Pro or hydrophobic amino acids are reported to be the most favorable sequences for ACE inhibition.¹⁰ Alcalase and Savinase produced hydrolysates with a higher yield of shorter peptide sequences (Figure 2A,B) that, in conjunction with their specificity for aromatic or hydrophobic residues at position P1²², is consistent with their higher ACE-inhibitory efficacy. ACE-inhibitory activity of hydrolysates gradually increased ($P \leq 0.05$), reaching maximum values after 1–3 h depending on the enzyme, while this activity decreased with extended hydrolysis time ($P \leq 0.05$) likely due to active amino acid sequences were cleaved by protease. IC₅₀ values were calculated for A3 and S2 hydrolysates, selected for their highest ACE-inhibitory activities. The selected hydrolysis time (3 h for Alcalase and 2 h for Savinase) was chosen because no significant improvements were found with further digestion times ($P \geq 0.05$). The A3 and S2 hydrolysates exhibited significantly different ($P \leq 0.05$) IC₅₀ values of 0.25 ± 0.02 and 0.18 ± 0.02 mg of protein/mL, respectively. It is worth noting the considerably higher ACE-inhibitory activity of S2 hydrolysates compared to A3 hydrolysates ($P \leq 0.05$). These results suggest that Savinase should generate peptides with more favorable amino acid sequences than Alcalase. As far as we know, this is the first evidence showing the effectiveness of Savinase in releasing ACE-inhibitory peptides from legume proteins. IC₅₀ values of ACE-inhibitory peptides in A3 and S2 hydrolysates are higher when compared to activities of peptides released from lentil proteins by gastrointestinal enzymes (0.43 – 0.89 mg/mL).^{14,33,34} Moreover, the ACE-inhibitory activity of S2 hydrolysates found in this work is within the range of reported IC₅₀ values for red and green lentil concentrates hydrolyzed by Alcalase/Flavourzyme, bromelain, and papain (0.19 – 0.08 mg/mL), although it is noteworthy that much longer hydrolysis time (8 h) were used in the case of both plant proteases.¹³ The ACE-inhibitory activity of A3 and S2 hydrolysates is quite promising in comparison to activities reported for Alcalase hydrolysates from different legumes such as cowpea, chickpea, mung bean, and soybean, exhibiting IC₅₀ values ranging from 2.5 to 0.13 mg/mL.^{23,25,27,35}

Antioxidant Activity of Lentil Protein Hydrolysates.

The effect of hydrolysis time and protease type on the potential antioxidant activity of lentil hydrolysates was determined by the ORAC-FL method, which reflects peroxy radical scavenging activity.³⁶ Antioxidant mechanism assayed with ORAC method is based on a hydrogen atom transfer mechanism. A radical initiator is used to generate peroxy radical ROO• that abstracts a hydrogen atom from antioxidant molecules present in the sample. Results in Table 2 indicate that ORAC values of nonhydrolyzed lentil proteins were significantly lower compared to those of lentil hydrolysates ($P \leq 0.05$). Hydrolysis time and protease used greatly affected the radical scavenging activity of lentil protein hydrolysates. Hydrolysates produced with Alcalase, Savinase, and Corolase 7089 displayed a gradual increase in peroxy radical scavenging activity, reaching the highest values after 4, 2, and 3 h, respectively ($P \leq 0.05$). In contrast, Protamex hydrolysates showed the highest activity ($P \leq 0.05$) at the shortest time (1 h), after which a gradual decrease was observed ($P \leq 0.05$). The differences in antioxidant activity observed at different hydrolysis times could be attributable to the different peptides and amino acid sequences released during hydrolysis. This leads to a difference in their ability to act as

Table 2. Effect of Hydrolysis Time and Protease Type on Antioxidant Activity of Lentil Hydrolysates^a

time (h)	ORAC (μmol of Trolox/mg of protein)			
	A	S	P	C
0	0.43 ± 0.02 A a	0.43 ± 0.02 A a	0.44 ± 0.02 A a	0.44 ± 0.03 A a
1	0.57 ± 0.03 B bc	0.52 ± 0.03 BC a	0.58 ± 0.03 E c	0.53 ± 0.04 BC ab
2	0.64 ± 0.2 C c	0.81 ± 0.02 F d	0.56 ± 0.03 CD b	0.50 ± 0.04 B a
3	0.62 ± 0.03 C b	0.75 ± 0.07 E c	0.55 ± 0.04 BCD a	0.54 ± 0.04 CD a
4	0.70 ± 0.05 D c	0.62 ± 0.05 D b	0.49 ± 0.02 B a	0.59 ± 0.02 D b
5	0.70 ± 0.04 D b	0.56 ± 0.05 C a	0.53 ± 0.03 BC a	0.55 ± 0.03 CD a
6	0.57 ± 0.03 B c	0.49 ± 0.05 B a	0.51 ± 0.04 AB ab	0.53 ± 0.02 BC bc

^aData indicate mean value \pm standard deviation of two independent experiments. Different uppercase letters within a column are significantly different ($P < 0.05$, Duncan's test). Different lowercase letters within a row are significantly different ($P < 0.05$, Duncan's test). A, Alcalase; S, Savinase; P, Protamex; C, Corolase 7089.

donors of hydrogen atoms that may inhibit oxidative chain reactions or prevent their initiation. Higher antioxidant activity potential of A4 and S2 hydrolysates may be explained by the higher efficiency of Alcalase and Savinase in producing smaller peptides (Figure 2A,B). The molecular weight of peptides is believed to play a key role in scavenging oxygen radicals. Recent studies pointed out that the radical scavenging activity of cowpea and bean protein hydrolysates increased with decreasing molecular weight.^{27,37} In fact, identified antioxidant peptides derived from food proteins are composed of 2–16 amino acid residues.³⁸ The higher efficiency of subtilases in releasing peroxy radical scavenging peptides observed in the present study is consistent with their preferential specificity to cleave hydrophobic amino acids, which have been shown to act as proton donors.³⁹ Comparison of the ORAC values showed that S2 hydrolysate exhibited the highest peroxy radical scavenging activity ($0.8 \mu\text{mol}$ of TE/mg of protein), followed by A4 hydrolysate ($0.7 \mu\text{mol}$ of TE/mg of protein). These results indicate that Savinase released antioxidant peptides with more favorable amino acid sequences than Alcalase. The ORAC values of permeates <3 kDa from S2 and A4 hydrolysates were also analyzed. Radical scavenging activity was 2-fold higher in these fractions compared to whole hydrolysates. A4 permeates exhibited $0.91 \pm 0.05 \mu\text{mol}$ of TE/mg of protein and S2 permeates exhibited $1.22 \pm 0.06 \mu\text{mol}$ of TE/mg of protein, suggesting that short peptides may be responsible for the potential antioxidant activity of protein hydrolysates, in agreement with previous studies.^{27,37} To our knowledge, this is the first study on the production of hydrolysates with antioxidant activity from lentil proteins. The antioxidant activity of A4 and S2 hydrolysates, measured by the ORAC-FL method, was more than 2 times higher compared to that of Alcalase hydrolysates from different soybean cultivars.⁴⁰ In addition, lentil hydrolysates produced by subtilases in the present study exhibited ORAC values within the range of reported values for common vegetables (green pepper, spinach, purple onion, broccoli, beet, and cauliflower) considered as leading sources of antioxidant activity against peroxy radicals (0.023 – $0.3 \mu\text{mol}$ of TE/mg dry weight).³⁶

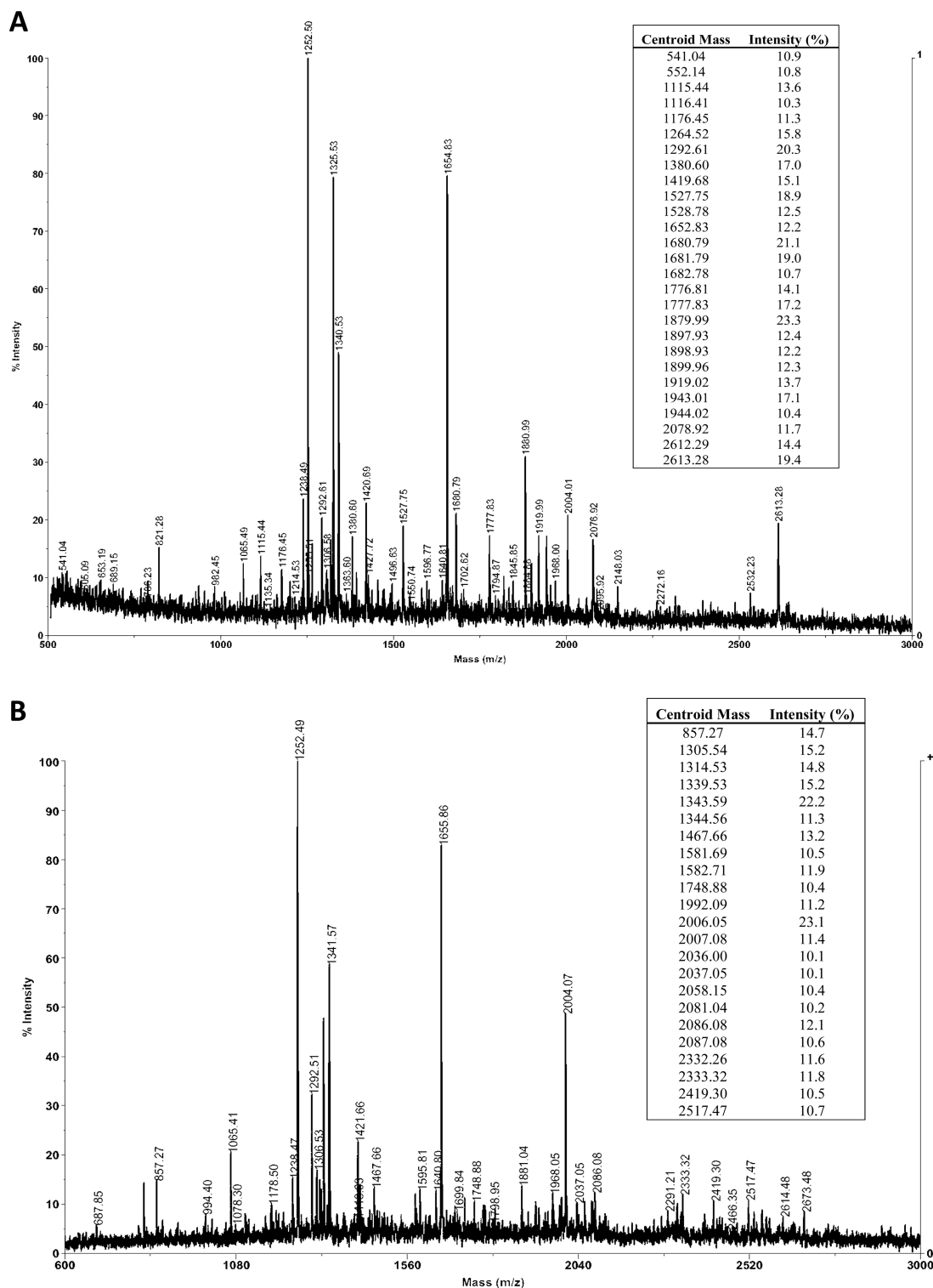


Figure 3. Peptide mass fingerprint of 3 kDa permeates of lentil hydrolysates: (A) A4 hydrolysate; (B) S2 hydrolysate. Mass spectra were obtained by MALDI-TOF in the reflector mode for positive ions. The respective table insets show differential peptide masses observed for each hydrolysate.

Peptide Mass Fingerprint of Selected Lentil Hydrolysates. A4 and S2 hydrolysates were selected for MALDI-

TOF analysis on the basis of their highest biological activities. Figure 3 shows mass spectra of the 3 kDa permeates of A4 and

S2 hydrolysates. Comparison of the spectra showed similarities between A4 and S2 hydrolysates such as the presence of high-intensity signals (m/z 1251.1–1255.5, 1325.5–1327.5, 1340.5–1342.5, 1652.8–1657.8, and 2004.0–2007.1) referred to either matrix-related clusters or peptides that could represent concomitants including nonspecific digestion products.^{41,42} It is worth noting that A4 and S2 hydrolysates showed differential peptide masses with reduced intensity (see the inset mass peptide list in Figure 3). The different peptide profiles observed for A4 and S2 hydrolysates indicates that Alcalase and Savinase have different enzyme specificities, which is consistent with the above-mentioned results.

Identification of Bioactive Multifunctional Peptides.

S2 hydrolysate was selected for peptide identification on the basis of its higher ACE-inhibitory and antioxidant activities, and the 3 kDa permeate was analyzed by reverse-phase (RP) HPLC–tandem mass spectrometry (MS/MS). Table 3 shows the list of peptides identified that contain, within their amino acid sequences, reported ACE-inhibitory (boldface) and antioxidant activity (underlined) sequences according to BIOPEP database. Identified peptides were fragments derived from lentil storage proteins (convicilin, vicilin, legumin, and albumin), allergen Len c 1, and lectin having at the C-terminus residues such as alanine (A), valine (V), leucine (L), tyrosine (Y), phenylalanine (F), and tryptophan (W). The presence of some of these amino acids in the ultimate position fulfils the rule proposed by Cheung et al.⁴³ about residues being preferred for ACE inhibitors and substrates. Moreover, peptides identified were characterized by the presence of several hydrophobic amino acids such as Ala (A), Pro (P), Val (V), Ile (I), Leu (L), Phe (F), Trp (W), Tyr (Y), and Met (M), which may act as proton donors.³⁹ Specifically, Tyr (Y) and Trp (W) have been reported as mainly responsible for the antioxidant activity of peptides in the ORAC-FL model.^{44,45} In some peptides His (H) was also found, which has been commonly associated with antioxidant activity due to its hydrogen-donating and radical-trapping imidazole ring.³⁹ Taken all together, identification of the amino acid sequence of peptides in Savinase lentil hydrolysates has demonstrated their multifunctional properties that could make an important contribution in dietary interventions for prevention/therapy of hypertension. This is the first study showing an exhaustive characterization of the peptide fraction of lentil protein hydrolysates. So far, only three ACE-inhibitory peptides (KLRT, TLHGMV, and VNRLM) released by sequential pepsin–pancreatin hydrolysis from lentil proteins have been identified,³³ and none of them were identified in the present work.

Stability of ACE-Inhibitory and Antioxidant Peptides in Selected Lentil Hydrolysate to Gastrointestinal Digestion. There are numerous *in vivo* studies in animal models of hypertension and human clinical studies in hypertensive patients showing that oral administration of bioactive peptides from food proteins with ACE-inhibitory activity or foods containing these peptides results in the reduction of hypertension.⁴⁶ This body of evidence demonstrates that ACE-inhibitory peptides can resist gastrointestinal digestion to be absorbed in the intestine and ultimately reach the target molecule. Nevertheless, gastrointestinal enzymes may cause structural degradation of bioactive peptides and loss of their bioactivity. Therefore, it is important to determine their stability to gastrointestinal digestion. For this purpose, the most potent peptide fraction (3 kDa permeate of S2 hydrolysate) was

Table 3. Amino Acid Sequences Found in 3 kDa Permeates of S2 Lentil Hydrolysates

MH ⁺ (Da)	peptide sequence ^a	protein	accession nos.
1252.78	DLPVLRWL	legumin A	388256; 483449; 126161
1252.78	DLPVLRWLKL	legumin A	388256; 483449; 126161
1927.07	DRRQEINKENVIVKVS	allergen Len c 1.0102	Q84UI0
835.47	EGGLLLPH	convicilin	Q9M3X8
1982.11	EGSLLPHYNSRAIVIVT	vicilin	137582; 1297072
1876.87	FEGTVFENGIDAAYRST	albumin-2	113570
977.57	INDKYVLL	albumin-2	P86782
1237.72	LFINDKYVLL	albumin-2	P86782
1002.55	NEDVIVKVS	allergen Len c 1.0101	Q84UI1
1831.99	NLERGDTIKLPAGTIAY	allergen Len c 1.0101	Q84UI1; Q84UI0
1945.07	NLERGDTIKLPAGTIAYL	allergen Len c 1.0101	Q84UI1; Q84UI0
2245.15	NRFQTLYENENGHIRLLQ	allergen Len c 1.0101	42414629; 29539109; 29539111
1499.84	QEINKENVIVKVS	allergen Len c 1.0102	Q84UI0
2131.10	RFQTLYENENGHIRLLQ	allergen Len c 1.0101	42414629; 29539109; 29539111
1269.69	RLSAEYVRLY	legumin type B	126164; 126170
1725.01	RRQEINKENVIVKV	allergen Len c 1.0102	Q84UI0
1927.07	RRQEINKENVIVKVS	allergen Len c 1.0102	Q84UI0
1098.63	SLDLPVLRW	legumin A	483449; 126161
1212.72	SLDLPVLRWL	legumin A	483449; 126162
1421.80	SVEIKEGSLLLPH	vicilin	137582; 1297072
1698.91	SVEIKEGSLLLPHYN	vicilin	137582; 1297072
1785.94	SVEIKEGSLLLPHYNS	vicilin	137582; 1297072
1377.74	SVEINEGGLLLPH	convicilin	7688242
1540.80	SVEINEGGLLLPHY	convicilin	Q9M3X8
1897.98	SVEINEGGLLLPHYNSR	convicilin	Q9M3X8
1817.93	SWNLQNGERANVVI AF	lectin	Q93WH6; Q93X49
1312.76	TSLDLPVLRWL	legumin A	483449; 126161
1512.88	TVTSLDLPVLRWL	legumin A	483449; 126161
2538.43	VEIKEGSLLLPHYNSR	vicilin	137582; 1297072
1290.70	VEINEGGLLLPH	convicilin	7688242
1634.91	VNSVEIKEGSLLLPH	vicilin	137582; 1297072
2155.15	VNSVEIKEGSLLLPHYNSR	vicilin	137582; 1297072

^aBoldface and underlined sequence regions correspond to reported ACE-inhibitory and antioxidant activity, respectively, in BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>) and Wu et al.⁴⁷

further sequentially digested with pepsin and pancreatin to simulate gastrointestinal digestion. Some studies have reported a relationship between peptide structure and bioavailability; thus, small hydrophobic peptides tend to be resistant to gastrointestinal digestion and, therefore, are generally absorbed.⁴⁸ Accordingly, based on the cleavage mechanism of

Savinase, lentil hydrolysates produced in the present study were hydrophobic and with molecular masses below 3 kDa, which supports the potential bioavailability of such hydrolysates. Figure 4 shows ACE-inhibitory and antioxidant activities of 3

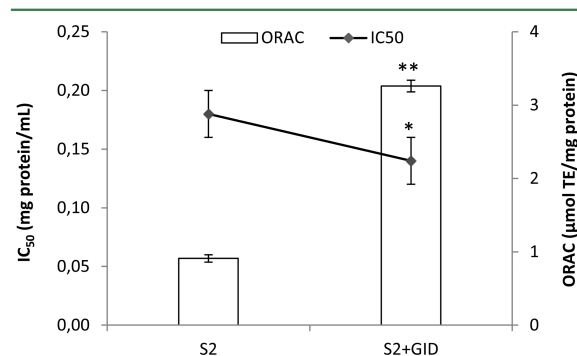


Figure 4. Stability to gastrointestinal digestion of ACE-inhibitory and antioxidant activity of 3 kDa permeates of A3 and S2 hydrolysates. Lines represent ACE-inhibitory activity, and bars show antioxidant activity before and after in vitro gastrointestinal digestion. *Statistical difference at $P < 0.05$; **Statistical difference at $P < 0.001$ (Duncan's test).

kDa permeate of S2 hydrolysate before and after in vitro gastrointestinal digestion. When peptides were subjected to in vitro gastrointestinal digestion, IC₅₀ was slightly lower (0.14 mg of protein/mL) compared to that before digestion (0.18 mg of protein/mL), which indicates a higher ACE-inhibitory potency ($P \leq 0.05$). In addition, antioxidant activity of peptides in the 3 kDa fraction increased 3 times after gastrointestinal digestion ($P \leq 0.05$). These results suggest that peptides in S2 hydrolysates were either resistant or liberated new fragments with ACE-inhibitory and antioxidant activity after simulated gastrointestinal digestion. As consequence, peptides in S2 hydrolysate could preserve or improve its multifunctionality in the gastrointestinal tract.

In conclusion, this study reveals that subtilisins are the most suitable enzymes for lentil proteolysis and production of hydrolysates with ACE-inhibitory and antioxidant activities. The highest ACE-inhibitory and antioxidant activities were found in lentil hydrolysates treated with Savinase for 2 h at 40 °C. Therefore, Savinase is the best choice for cost-effective production of lentil multifunctional hydrolysates. Several peptides with amino acid sequences rich in hydrophobic amino acids were identified in these hydrolysates, which make them potential contributors to the dual bioactivity detected. Multifunctional hydrolysates could encourage value-added utilization of lentil proteins as functional ingredients of nutraceuticals for prevention of hypertension and cardiovascular diseases.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail c.m.villaluenga@csic.es; tel +34 912587601; fax +34 915644853

Funding

This work was funded by the AGL2010-16310 project from the MINECO (Ministerio de Economía y Competitividad from Spain).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank MINECO for granting P.G.-M. a predoctoral fellowship

ABBREVIATIONS

ACE, angiotensin I-converting enzyme; ACN, acetonitrile; DH, degree of hydrolysis; HPLC, high-performance liquid chromatography with photodiode array detection; LTQ, linear trap quadrupole; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight; MM, molecular mass; ORAC, oxygen radical absorbance capacity; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; TE, Trolox equivalents; TFA, trifluoroacetic acid

REFERENCES

- (1) World Health Organization (WHO). Cardiovascular diseases (CVDs), 2009 (Access date: 03 September 2013).
- (2) Hong, F.; Ming, L.; Yi, S.; Zhanxia, L.; Yongquan, W.; Chi, L. The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs? *Peptides* **2008**, *29*, 1062–1071.
- (3) Skeggs, L. T.; Dorer, F. E.; Levine, M.; Lentz, K. E.; Kahn, J. R. The biochemistry of the renin-angiotensin system. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1980**, *130*, 1–27.
- (4) Bagatini, M. D.; Martins, C. C.; Battisti, V.; Gasparetto, D.; da Rosa, C. S.; Spanevello, R. M.; Ahmed, M.; Schmatz, R.; Chitolina Schetinger, M. R.; Morsch, V. M. Oxidative stress versus antioxidant defenses in patients with acute myocardial infarction. *Heart Vessels* **2011**, *26*, 55–63.
- (5) Ray, P. D.; Huang, B.-W.; Tsuji, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* **2012**, *24*, 981–990.
- (6) Toeroek, J. Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension. *Physiol. Res.* **2008**, *57*, 813–825.
- (7) Mattson, M. P. Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Exp. Gerontol.* **2009**, *44*, 625–633.
- (8) Agyei, D.; Danquah, M. K. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 272–277.
- (9) Udenigwe, C. C.; Aluko, R. E. Multifunctional cationic peptide fractions from flaxseed protein hydrolysates. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2012**, *67*, 1–9.
- (10) Erdmann, K.; Cheung, B. W. Y.; Schroeder, H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *J. Nutr. Biochem.* **2008**, *19*, 643–654.
- (11) Hernandez-Ledesma, B.; del Mar Contreras, M.; Recio, I. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *165*, 23–35.
- (12) Northern Pulse Growers Association. <http://www.northernpulse.com/growers/> (Access date: 19 September 2013).
- (13) Barbana, C.; Boye, J. I. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. *Food Chem.* **2011**, *127*, 94–101.
- (14) Boye, J. I.; Roufik, S.; Pesta, N.; Barbana, C. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties and SDS-PAGE of red lentil protein hydrolysates. *Food Sci. Technol.* **2010**, *43*, 987–991.
- (15) Contreras, M. M.; Hernandez-Ledesma, B.; Amigo, L.; Martín-Alvarez, P. J.; Recio, I. Production of antioxidant hydrolysates from a whey protein concentrate with thermolysis: Optimization by response surface methodology. *Food Sci. Technol.* **2011**, *44*, 9–15.
- (16) Adler-Nissen, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* **1979**, *27*, 1256–1262.

- (17) Sentandreu, M. Á.; Toldrá, F. A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2423–2427.
- (18) Torino, M. I.; Limon, R. I.; Martínez-Villaluenga, C.; Makinen, S.; Pihlanto, A.; Vidal-Valverde, C.; Frias, J. Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chem.* **2013**, *136*, 1030–1037.
- (19) Moreno, F. J.; Mellon, F. A.; Wickham, M. S. J.; Bottrill, A. R.; Mills, E. N. C. Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. *FEBS J.* **2005**, *272*, 341–352.
- (20) Roy, F.; Boye, J. I.; Simpson, B. K. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 432–442.
- (21) Barbana, C.; Boucher, A. C.; Boye, J. I. In vitro binding of bile salts by lentil flours, lentil protein concentrates and lentil protein hydrolysates. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 174–180.
- (22) Gupta, R.; Beg, Q. K.; Lorenz, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *59*, 15–32.
- (23) Medina-Godoy, S.; Ambriz-Perez, D. L.; Fuentes-Gutierrez, C. I.; German-Baez, L. J.; Gutierrez-Dorado, R.; Reyes-Moreno, C.; Valdez-Ortiz, A. Angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidative activities and functional characterization of protein hydrolysates of hard-to-cook chickpeas. *J. Sci. Food Agric.* **2012**, *92*, 1974–1981.
- (24) Yust, M. M.; Pedroche, J.; Giron-Calle, J.; Alaiz, M.; Millan, F.; Vioque, J. Production of ACE inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Food Chem.* **2003**, *81*, 363–369.
- (25) Li, G. H.; Le, G. W.; Liu, H.; Shi, Y. H. Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Food Sci. Technol. Int.* **2005**, *11*, 281–287.
- (26) Rui, X.; Boye, J. I.; Simpson, B. K.; Prasher, S. O. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of Phaseolus vulgaris bean hydrolysates: Effects of different thermal and enzymatic digestion treatments. *Food Res. Int.* **2012**, *49*, 739–746.
- (27) Segura Campos, M. R.; Chel Guerrero, L. A.; Betancur Ancona, D. A. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions extracted by ultrafiltration of cowpea Vigna unguiculata hydrolysates. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90*, 2512–2518.
- (28) Durak, A.; Baraniak, B.; Jakubczyk, A.; Swieca, M. Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. *Food Chem.* **2013**, *141*, 2177–2183.
- (29) van der Ven, C.; Gruppen, H.; de Bont, D. B. A.; Voragen, A. G. J. Reversed phase and size exclusion chromatography of milk protein hydrolysates: relation between elution from reversed phase column and apparent molecular weight distribution. *Int. Dairy J.* **2001**, *11*, 83–92.
- (30) ExPASy: Bioinformatic resource portal. (www.expasy.org) (Accessed date: 13 July 2013).
- (31) Hernandez-Alvarez, J. A.; Carrasco-Castilla, J.; Davila-Ortiz, G.; Alaiz, M.; Giron-Calle, J.; Vioque-Pena, J.; Jacinto-Hernandez, C.; Jimenez-Martinez, C. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory activity in protein hydrolysates from normal and anthracnose disease-damaged Phaseolus vulgaris seeds. *J. Sci. Food Agric.* **2013**, *93*, 961–966.
- (32) Sirtori, C. R.; Galli, C.; Anderson, J. W.; Sirtori, E.; Arnoldi, A. Functional foods for dyslipidaemia and cardiovascular risk prevention. *Nutr. Res. Rev.* **2009**, *22*, 244–261.
- (33) Akillioglu, H. G.; Karakaya, S. Effects of heat treatment and in vitro digestion on the angiotensin converting enzyme inhibitory activity of some legume species. *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, *229*, 915–921.
- (34) Jakubczyk, A.; Baraniak, B. Activities and sequences of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides obtained from the digested lentil (*Lens culinaris*) globulins. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2013**, *48*, 2363–2369.
- (35) Kuba, M.; Tana, C.; Tawata, S.; Yasuda, M. Production of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein with *Monascus purpureus* acid proteinase. *Process Biochem.* **2005**, *40*, 2191–2196.
- (36) Ou, B. X.; Huang, D. J.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J. A.; Deemer, E. K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3122–3128.
- (37) Carrasco-Castilla, J.; Javier Hernandez-Alvarez, A.; Jimenez-Martinez, C.; Jacinto-Hernandez, C.; Alaiz, M.; Giron-Calle, J.; Vioque, J.; Davila-Ortiz, G. Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. *Food Chem.* **2012**, *135*, 1789–1795.
- (38) Sarmadi, B. H.; Ismail, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* **2010**, *31*, 1949–1956.
- (39) Elias, R. J.; Kellerby, S. S.; Decker, E. A. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2008**, *48*, 430–441.
- (40) Darmawan, R.; Bringe, N. A.; de Mejia, E. G. Antioxidant capacity of alcalase hydrolysates and protein profiles of two conventional and seven low glycinin soybean cultivars. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2010**, *65*, 233–240.
- (41) Keller, B. O.; Li, L. Discerning matrix-cluster peaks in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectra of dilute peptide mixtures. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 88–93.
- (42) Harris, W. A.; Janecki, D. J.; Reilly, J. P. Use of matrix clusters and trypsin autolysis fragments as mass calibrants in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 1714–1722.
- (43) Cheung, H. S.; Wang, F. L.; Ondetti, M. A.; Sabo, E. F.; Cushman, D. W. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 401–407.
- (44) Elias, R. J.; Bridgewater, J. D.; Vachet, R. W.; Waraho, T.; McClements, D. J.; Decker, E. A. Antioxidant mechanisms of enzymatic hydrolysates of β -lactoglobulin in food lipid dispersions. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9565–9572.
- (45) Hernández-Ledesma, B.; Dávalos, A.; Bartolomé, B.; Amigo, L. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 588–593.
- (46) Foltz, M.; van Buren, L.; Klaffke, W.; Duchateau, G. S. M. J. E. Modeling of the relationship between dipeptide structure and dipeptide stability, permeability, and ACE inhibitory activity. *J. Food Sci.* **2009**, *74*, H243–H251.
- (47) Wu, J.; Yuan, L.; Aluko, R. E. Restriction of the in vitro formation of angiotensin II by leuciny-arginyl-tryptophan, a novel peptide with potent angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70*, 1277–1280.
- (48) Martínez-Maqueda, D.; Miralles, B.; Recio, I.; Hernández-Ledesma, B. Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Food Funct.* **2012**, *3*, 350–361.

Publicación II: Identificación, estabilidad gastrointestinal y docking molecular de péptidos de lenteja con actividades antioxidante e inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I.

P. García-Mora, M. Martín-Martínez, M. A. Bonache, R. González-Múniz, E. Peñas, J. Frias, C. Martínez-Villaluenga. Identification, gastrointestinal stability and molecular docking studies of lentil peptides with dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (enviado).

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue identificar péptidos con actividades antioxidante e inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) obtenidos a partir de hidrolizados proteicos de lenteja mediante hidrólisis enzimática con Savinasa® 16L. Además, se evaluó la influencia de la digestión gastrointestinal en la bioactividad de dichos péptidos. Los péptidos más abundantes identificados pertenecían a fragmentos de las proteínas de almacenamiento presentes en la lenteja: vicilina, convicilina y legumina. Los péptidos LLSGTQNQPSFLSGF, NSLTLPIRLYL, TLEPNSVFLPVLLH fueron los que presentaron mayor actividad antioxidante y actividad inhibidora de la ECA (TE = 0,013 a 1,432 μmol Trolox / μmol de péptido; IC_{50} = 44 a 120 μM). La digestión gastrointestinal de los péptidos DLAIQVNRPGQLQSF, LLSGTQNQPSFLSGF, NSLTLPIRLYL, TLEPNSVFLPVLLH mejoró notablemente la doble actividad biológica de los mismos (TE = 10-14 μmol Trolox / μmol de péptido; IC_{50} = 11-21 μM). El heptapéptido del extremo C-terminal fue determinante para las actividades antioxidante e inhibidora de la ECA, a excepción del péptido TLEPNSVFLPVLLH, en el que se observó que los residuos del extremo N-terminal también contribuían a su capacidad para atrapar radicales peroxilo. Las propiedades electrónicas, hidrofóbicas y estéricas de los residuos de aminoácidos de la región C-terminal estaban relacionadas con las propiedades antioxidantes de los péptidos, mientras que aminoácidos cargados positivamente e hidrofóbicos se relacionaron con una potente actividad inhibidora de la ECA. Los resultados de docking molecular mostraron que la actividad inhibidora de la ECA de los péptidos más potentes se explica por la unión de los péptidos al centro activo de

Resultados

la enzima mediante una red de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Los resultados de este estudio apoyan la posible aplicación de los péptidos de lenteja como ingredientes en alimentos funcionales y nutracéuticos que ayuden a prevenir la hipertensión.

Identification, functional gastrointestinal stability and molecular docking studies of lentil peptides with dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities.

Patricia García-Mora^{*}, Mercedes Martín-Martínez[†], María Angeles Bonache[†], Rosario González-Múniz[†], Elena Peñas^{*}, Juana Frias^{*}, Cristina Martínez-Villaluenga^{*}

^{*}Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Juan de la Cierva, 3, 28006 Madrid, Spain

[†]Instituto de Química Médica (IQM-CSIC), Juan de la Cierva, 3, 28006 Madrid, Spain

1 **ABSTRACT**

2 The objective was to identify peptides with dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme
3 (ACE) inhibitory activities released from lentil proteins by Savinase® 16 L. The influence of
4 gastrointestinal digestion on peptide bioactivity was also assayed. Fragments from vicilin, convicilin
5 and legumin proteins were the most abundant peptides identified. Peptides LLSGTQNQPSFLSGF,
6 NSLTLPIRLYL, TLEPNSVFLPVLLH showed the most potent antioxidant and ACE inhibitory
7 activities (TE=0.013-1.432 $\mu\text{mol Trolox}/\mu\text{mol peptide}$; IC_{50} =44-120 μM). Gastrointestinal digestion
8 of peptides DLAIQVNRPGQLQSF, LLSGTQNQPSFLSGF, NSLTLPIRLYL, TLEPNSVFLPVLLH
9 improved markedly their dual activity (TE=10-14 $\mu\text{mol Trolox}/\mu\text{mol peptide}$; IC_{50} =11-21 μM). C-
10 terminal heptapeptide residues of these peptides were determinants for their antioxidant and ACE
11 inhibitory activities with the exception of peptide TLEPNSVFLPVLLH in which N-terminal
12 residues were also contributing to peroxyl radical scavenging properties. Electronic, hydrophobic
13 and steric properties of amino acid residues in the C-terminal region were consistent with higher
14 antioxidant properties while positively charged amino acids and hydrophobic amino acid residues
15 were related to a higher ACE inhibitory potency. Molecular docking results showed that ACE
16 inhibitory activity of the most potent peptides was potentially due to a network of hydrogen bonds,
17 together with hydrophobic interactions. In summary, results from this study support the possible
18 application of lentil peptides as functional food ingredients or nutraceuticals to prevent hypertension.

19 *Keywords:* ACE inhibitory activity, antioxidant activity, lentil peptides, gastrointestinal digestion,
20 molecular docking

21

22 INTRODUCTION

23 Hypertension is a chronic disease characterized by insufficient relaxation of blood vessels which is
24 associated to an increased risk of cerebrovascular and cardiovascular diseases. These diseases affect
25 millions of people annually, resulting in extensive morbidity and mortality (1). Human blood
26 pressure is regulated by systemic renin-angiotensin system (RAS) that relies on a proteolytic cascade
27 involving two key proteases, namely, renin (EC 3.4.23.15), an aspartyl protease secreted into the
28 blood from the liver, and angiotensin I converting enzyme (ACE; EC 3.4.15.1), a carboxipeptidase
29 present on the external surface of endothelial cells of the lung (2). Renin, converts angiotensinogen, a
30 serum α 2-globulin produced in the liver, into the inactive decapeptide angiotensin I. This peptide is
31 hydrolyzed by ACE to form the vasoactive octapeptide angiotensin II to cause vasoconstriction (3).
32 ACE also inactivates bradykinin, a vasodilatory peptide that contributes to blood pressure elevation.
33 Hypertension has been related to increased activity of renin and/or ACE and high blood angiotensin
34 II levels (4). Besides RAS, other important mechanism to regulate blood pressure is the production
35 of nitric oxide (NO) by endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (5). NO is a vasodilatory molecule
36 that helps to maintain normal blood pressure levels. Studies have shown that inadequate antioxidant
37 protection or excessive production of reactive oxygen species (ROS) create a condition known as
38 oxidative stress that lead to changes in eNOS activity and reduction of NO bioavailability and
39 impaired vasodilatory responses (6). Traditional drug therapies for hypertension have involved the
40 use ACE or renin inhibitors (7, 8). More recently, antioxidant agents have also been proven to
41 increase NO bioavailability and to prevent the damage that ROS cause in patients with hypertension
42 (9, 10). On the basis of the multiple hypertension-inducing factors, future prospects are focused on
43 developing new agents targeting multiple pathways including vasoconstriction, oxidative stress and
44 inflammation (10).

45 Because antihypertensive drugs can cause negative side effects, they are believed to reduce patients
46 compliance leading eventually to exacerbated disease conditions, an increased health care costs.

47 Therefore, there has been increased interest in developing natural compounds that could replace or
48 complement antihypertensive drugs due to reduced side effects associated to their consumption so far
49 (11). Natural peptides exhibiting significant potency to reduce blood pressure in preclinical and
50 clinical studies have been produced from several food-derived proteins through enzymatic
51 hydrolysis, fermentation or gastrointestinal digestion (4). In particular, legume storage proteins
52 (mainly 11S and 7S globulins) are abundant sources of bioactive peptides (12) that have been used as
53 raw materials for the production of hydrolysates with potential antihypertensive effects (13-16);
54 however, the identification of peptides responsible for the biological function is still limited. Recent
55 approaches are being made in the field of production such as the selection of proteolytic enzymes
56 that facilitate the production of active fragments from legume proteins (15, 17, 18). In these sense,
57 our previous studies have shown that out of five food-grade enzymatic preparations, Savinase® 16 L
58 was the most effective to produce multiactive hydrolysates with antioxidant, ACE inhibitory and
59 anti-inflammatory activities from lentil and bean protein concentrates (19, 20). Despite the potential
60 bioactive properties, there is still a scarcity of information in the area of structure-function of
61 legume-derived peptides. Research progress has shown that N-terminal and C-terminal regions are
62 the dominating poles for only one biological function of peptides (21-24). C-terminal residues are
63 considered the ideal peptide sequence for seeking ACE inhibitors (23) and potent antioxidant
64 peptides (24). Moreover, current challenges are related to determine the amino acid properties
65 positioned on the N-terminal and C-terminal of the peptides to exert their biological function (14, 24,
66 25).

67 The main objective of this study was to identify lentil-derived peptides with dual antioxidant and
68 ACE inhibitory activity in order to use them as nutraceuticals or functional ingredients. To exert a
69 positive health effect, bioactive peptides functionality must be maintained upon gastrointestinal
70 digestion. Therefore, we have determined functional stability of peptides after simulated
71 gastrointestinal digestion. C-terminal heptapeptides residues were synthesized to determine

72 important regions in the peptide sequence and physicochemical properties of amino acid residues for
73 dual activity. We have also used molecular modelling to predict human somatic ACE in complex
74 with the most potent lentil-derived ACE inhibitory peptides.

75 **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

76 **Materials.** Lentil seeds (*Lens culinaris* var. Castellana) were provided by Semillas Iglesias S.A.
77 (Salamanca, Spain) and stored in polyethylene bins at 4 °C. Commercial food grade Savinase® 16 L,
78 an alkaline serine protease from *Bacillus* sp., was kindly provided by Novozymes (Bagsvaerd,
79 Denmark). Tripeptide Abz-Gly-Phe(NO₂)-Pro was purchased from Cymit-Quimica (Barcelona,
80 Spain). O-(6-Chlorobenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphate (HCTU),
81 N,N-diisopropylethylamine (DIEA), trifluoroacetic acid (TFA), triisopropylsilane (TIPS), Fmoc-His
82 (Trt)-wang resin (0.8 mmol/g) and Fmoc-Asn (Trt)-wang resin (0.8 mmol/g) were from Sigma-
83 Aldrich (Madrid, Spain). N-Fluorenyl-9-methoxycarbonyl (Fmoc) protected L-amino acids (Fmoc-
84 Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH,
85 Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-
86 Lys(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(Trt)-OH, Fmoc-Thr(Trt)-OH, Fmoc-
87 Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH), Fmoc-Phe-wang resin (0.86 mmol/g), Fmoc-Leu-wang resin (0.64
88 mmol/g) were provided by Novabiochem (Madrid, Spain). N,N-Dimethylformamide (DMF) and
89 dichloromethane (DCM) were dried and purified by standard methods. All other chemicals were
90 purchased from Sigma–Aldrich Quimica (Madrid, Spain) unless otherwise specified.

91 **Preparation of lentil hydrolysates.** Lentil proteins were isolated using alkaline extraction as
92 described previously (19). Freeze-dried lentil proteins were suspended in deionized water (2%, w/v),
93 equilibrated at 40 °C and adjusted to pH 8 with 1 M NaOH. Savinase® 16 L was added at a final
94 enzyme to substrate ratio (E/S) of 0.1 AU/mg of soluble lentil protein. Hydrolysis was performed at
95 40 °C for 2 h with the pH maintained in the range 7.9–8.3 by the addition of 1 M NaOH.

96 **Analysis of lentil hydrolysates by on-line nanoUPLC–ESI-MS/MS.** For peptide identification, 10
97 μg of lentil hydrolysate were desalted using a reverse phase (PorosR2©) column with 80%
98 acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid. Later, the peptides were dried and resuspended with 10 μL
99 0.1% TFA. An aliquot of 5 μL of resuspended sample was injected in the linear trap quadrupole
100 Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Peptides were loaded onto a C18-A1 ASY-Column 2 cm
101 precolumn (Thermo Scientific, Madrid, Spain) and then eluted onto a Biosphere C18 column (inner
102 diameter 75 μm , 15 cm long, 3 μm particle size) (NanoSeparations) at a flow rate of 250 nL/min on a
103 nanoEasy high-performance liquid chromatography (Proxeon) coupled to a nanoelectrospray ion
104 source (Proxeon). The mobile phases used consisted of 0.1% formic acid/2% acetonitrile (solvent A)
105 and 0.1% formic acid in 100% acetonitrile (solvent B). The solvent gradient was from 0% B to 35%
106 B in 140 min. Mass spectra were acquired in the positive ion mode. Full-scan MS spectra (m/z 400–
107 1800) were acquired with a target value of 1,000,000 at a resolution of 30,000 at m/z 400 and the 15
108 most intense ions were selected for collision induced dissociation fragmentation in the linear trap
109 quadrupole with a target value of 10,000 and normalized collision energy of 38%. Precursor ion
110 charge state screening and monoisotopic precursor selection were enabled. Singly charged ions and
111 unassigned charge states were rejected. Dynamic exclusion was enabled with a repeat count of 1 and
112 exclusion duration of 30 s. Proteome Discoverer 1.4.288 (Thermo Scientific) with MASCOT 2.3 was
113 used to search the NCBI database, taxonomy Viridiplantae (1530236 sequences sequences).
114 Database search parameters used were the following: peptide tolerance, 10 ppm; fragment ion
115 tolerance, 0.8 Da; none enzyme and variable modification, methionine oxidation. In all peptide
116 identifications, the probability scores were greater than the score fixed by Mascot as significant with
117 a p -value < 0.05 . The automatic decoy database search function of Protein Discover was enabled to
118 allow estimation of false discovery rate (FDR).

119 **Solid-phase synthesis of peptides.**

120 *Coupling procedure.* The corresponding Wang resin (100 mg), previously swollen in DMF and
121 DCM (1ml/100mg of resin, 30 s x 4), was treated with 20% piperidine in DMF (1 x 5min) and (1 x
122 20 min), for Fmoc removal, and washed with DMF/DCM/DMF/DCM/DMF (4 x 0.5 min). The
123 appropriate Fmoc amino acid (2 equiv.) was added to the resin along with HCTU/DIEA (2 equiv.) in
124 dry DMF (1mL/100mg of resin) at room temperature for 1 h and then washed with
125 DMF/DCM/DMF/DCM/DMF (4 x 0.5 min). The cycle described below is then repeated for each
126 amino acid until the target peptide was completely synthesized. Each coupling was monitored by the
127 ninhydrin or chloranile tests and, when necessary, repeated with a fresh portion of Fmoc-amino acid
128 and the indicated coupling reagents. The N-terminal Fmoc residue was finally removed with 20%
129 piperidine in DMF (1 x 5min) and (1 x 20 min), and the resin was washed with
130 DMF/DCM/DMF/DCM/DMF (4 x 0.5 min) and dried.

131 *Cleavage step.* Cleavage of peptides from the resin, and concomitant deprotection of side-chains,
132 was performed using TFA/H₂O/TIPS (95:2.5:2.5) (1 ml/100 mg of resin) at room temperature for 3
133 h. The resin was filtered off and crude products were precipitated with cold Et₂O. The resulting solid
134 was centrifuged and washed twice with ether, and then dissolved in H₂O or mixtures of
135 H₂O/acetonitrile and lyophilized.

136 *Peptide purification and characterization.* Peptides were purified by MPLC using SNAP cartridges
137 (12 g KP-C18-HS) in an ISOLERA ONE (BIOTAGE). A gradient of CH₃CN:H₂O (0.05% TFA)
138 from 0:100 to 30:70 over 60 min, as mobile phase, and a flow of 5 mL/min were used. Some
139 peptides were purified by semipreparative RP-HPLC-MS (Waters 2545) coupled to a mass
140 spectrometer 3100 detector, using a SUNFIRE™ column C18 (5 μm, 10x150 mm) and an 8
141 mL/min flow of a suitable CH₃CN (0.1% HCO₂H) [Solvent A]:H₂O (0.1% HCO₂H) [Solvent B]
142 gradient as mobile phase. The purity of peptides was analyzed using an analytical Agilent apparatus
143 (model 1120 Compact LC) equipped with an Eclipse Plus column C18 (4.6 x150 mm), at 1.5
144 mL/min flow, and a 5-50 CH₃CN [Solvent A]:H₂O (0.05% TFA) [Solvent B] gradient as mobile

145 phase, over 20 min. Characterization of the products was performed by ESI-MS (Waters, Micromass
146 ZQ 2000). Details are recorded in Table S1.

147 **Oxygen radical absorbance capacity.** Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) values of each
148 peptide were determined in triplicate following a previously reported method (19). Briefly, reactions
149 were performed using 20 μ L Trolox standard (1–160 μ M), or peptides or 20 μ L blank (75 mM
150 phosphate buffer pH 7.4), 120 μ L of 116.9 nM fluorescein (final concentration 70 nM/well) and 60
151 μ L of 40 mM AAPH per well. A black walled 96-well plate was read at 485 and 582 nm every 2 min
152 at sensitivity 60 and 37 °C using Synergy HT plate reader (Biotek, Winooski, VT). Results were
153 expressed as Trolox equivalents (TE, in μ mol Trolox/ μ mol peptide) and calculated using the
154 generated Trolox standard curve.

155 **Determination of ACE inhibitory activity.** Peptide ACE inhibition assay was determined in
156 triplicate using a previously reported method (19). The generated fluorescence was read every
157 minute for 30 min at emission and excitation wavelengths of 355 and 405 nm, respectively, in a
158 microplate fluorometer (Biotek, USA). ACE inhibitory activity was expressed as the peptide
159 concentration needed to inhibit 50% of ACE activity (IC_{50}). IC_{50} values were determined by dose-
160 response curves in which the range of concentrations (0-500 μ M) was distributed in a logarithmic
161 scale and using the nonlinear regression sigmoidal curve fit function in GraphPad Prism 4.00
162 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA).

163 **Simulated gastrointestinal digestion.** Synthesized peptides were subjected to gastric and duodenal
164 digestion according to the method described by Moreno *et al.* (26). Briefly, peptides were dissolved
165 in simulated gastric fluid (SGF, 0.15 M NaCl pH 2.5). Samples were pre-heated for 15 min at 37°C.
166 Then 400 μ L of a solution containing 0.59 % (w/v) porcine pepsin (EC 3.4.23.1, 3640 U/mg protein)
167 in SGF were added and the pH was adjusted to 2.5 with 0.01 M HCl. Digestion was performed at 37
168 °C for 2 h and subsequently stopped by increasing the pH to 7.5 with 0.1 M NaOH. Gastric digest
169 were adjusted to pH. 6.5 with 0.01 M HCl. In order to simulate a duodenal environment the

170 following solutions were added: 150.8 μL of a bile salt mixture containing equimolar quantities
171 (0.125 M) of sodium taurocholate and glycodeoxycholic acid (Sigma-Aldrich), 46.08 μL of 1 M
172 CaCl_2 (Merck, Darmstadt, Germany), 500 μL of 0.25 M Bis-Tris (pH 6.5), and 100 μL of pancreatin
173 from porcine pancreas (EC number 232-468-9) in SFG at pH 7.0. Digestion was carried out at 37 $^\circ\text{C}$
174 for 2h. Finally, pancreatin was inactivated by heating at 80 $^\circ\text{C}$ for 15 min.

175 **Molecular Docking, IFD Schrödinger.** Ligands were built using Maestro and prepared using
176 Ligprep module from Maestro 9.2 (Schrödinger Inc), with the OPLS2005 force field (27-29). Two
177 crystal structures were used in these studies of pdb codes 4APH and 4APJ, corresponding to sACE
178 bound to AngII and BPPb, respectively (30). The protein was prepared using the protein preparation
179 wizard within Maestro. Molecular docking studies were performed using the induced fit docking
180 protocol within the Schrödinger suite, this protocol is based in Glide 5.7 and Prime 3.0. In the first
181 step, ligands were docked to the rigid protein using the soft-potential docking with a van der
182 Waals radii scaling of 0.5, Glide grid was positioned on the centroid of AngII or BPPb. The resulting
183 top 20 poses of ligands were used to carry a conformational search and minimization of the
184 sidechain of ACE residues within 5 Å of the ligand with the Prime module. The ACE-peptide
185 complexes whose energy is within 30 kcal/mol of the global minimum were subject to a re-docking
186 with the Glide module. In this way, the flexibility of the protein around the ligand binding site is
187 considered.

188 **Molecular Docking, simulated annealing molecular dynamics.** The analysis of the IFD studies
189 allowed the selection of three docking binding poses for peptides **1h** and **3h**, and two for peptide **5h**.
190 The selected complexes were subjected to molecular dynamics simulations, which would allow
191 considering the flexibility of the whole complexes. Each ACE-peptide complex was solvated with
192 TIP3P water molecules and neutralized by Na^+ counterions. Molecular dynamics simulations were
193 performed with periodic boundary conditions using Amber and the FF12SB forcefield (31, 32).
194 Initially a 5000 step steepest descent, followed by 5000-steps conjugate gradient minimization was

195 performed to minimize steric clashes. Then, the system was heated from 0 K to at 300 K gradually
196 over 100 ps, using the positional restraint method, starting with a restraint weight of $5.0 \text{ Kcalmol}^{-1}\text{Å}^{-2}$
197 and an integration time step of 1.0 fs. First the solutes were restrained while the waters and counter-
198 ions were equilibrated in the first 25 ps, then progressively weaker restraints were applied till all
199 were removed in the last 100 ps under the NPT ensemble. The temperature was maintained at 300 K
200 using Langevin dynamics. For the production run an integration time step of 2.0 fs was used, while
201 hydrogen bonds were constrained using the SHAKE algorithm. The particle Mesh Ewald method
202 was used for the calculation of electrostatic interactions. A 5 ns production run was then carried out,
203 and the evaluation of the ACE-heptapeptide complex allowed the selection of one conformation for
204 each peptide, and for the selected complexes the production run was carried out till 40 ns. The
205 PyMOL Molecular Graphic System v1.7.0.1 (Schrödinger, LLC) was used for visualization and
206 making figures (33).

207 **Statistical analysis.** Statistical analysis was conducted using Statgraphics Centurion XVI software,
208 version 16.1.17 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, Md). Group mean comparisons were
209 conducted using Duncan's multiple-range test and were considered significant at $P < 0.05$ based on
210 the minimum significant differences from one-way analysis of variance (ANOVA) with $\alpha =$
211 0.05. Results are presented as means \pm standard deviation. All analyses were done at least in
212 triplicate.

213 **RESULTS AND DISCUSSION**

214 **Identification of most abundant peptides from 3 kDa permeates of lentil hydrolysate.** Previous
215 work in our laboratory demonstrated that 3 kDa permeates from lentil hydrolysates produced by
216 Savinase® 16 L for 120 min exert an inhibitory effect ($IC_{50} = 0.18 \text{ mg/mL}$) on ECA activity (19).
217 Most abundant peptides in this fraction were identified by liquid chromatography coupled to tandem
218 mass spectrometry (Table 1). A total of 8 peptides were found, corresponding to the major seed
219 storage proteins: 7S and 11S globulins. Blast results indicated that the peptides

220 DLAI PVNRPGLQSF (peptide 1), LLSGTQNQPSFLSGF (peptide 2), DLAI PVNPNPGQLESF
221 (peptide 6), RFQTIYNENGHIRLL (peptide 7) and EITPEKNPQLQDLDFVN (peptide 12)
222 matched sequences present in allergens Len c1.0101 and/or c1.0102, whereas NSLTLPIRLYL
223 (peptide 3), TLEPNSVFLPVLLH (peptide 5), LVNEGKGNLELVGF (peptide 9) matched
224 sequences of legumin type B, vicilin-like antimicrobial peptides 2-3 and convicilin, respectively. In
225 addition, the peptides 1 and 12 were also fragments corresponding to vicilin. Most of the identified
226 peptides contained C-terminal residues of Phe (F) and Leu (L), whereas only 2 peptides showed His
227 (H) and Gln (N) as C-terminal residues. This observation could be explained on the basis of the
228 broad specificity of *Bacillus* sp. alkaline serine proteases and their preferences for aromatic or
229 hydrophobic residues at position P1 of the cleavage site (34). All identified peptides were custom
230 synthesized in order to confirm or disprove their dual antioxidant and ACE inhibitory activity.

231 **Oxygen radical scavenging activity of lentil-derived peptides.** Antioxidant activity of synthesized
232 peptides was determined by the ORAC assay based on a hydrogen atom transfer mechanism (35).
233 This method uses a radical initiator (ABTS) to generate peroxy radical (ROO•) that abstracts a
234 hydrogen atom from antioxidant molecules present in samples. Trolox equivalents (TE) of
235 synthesized peptides varied from 0.004 to 1.43 $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol peptide}$ (Table 2). The antioxidant
236 activity of synthetic lentil-derived peptides was within the range of reported antioxidant activity for
237 amaranth 11S globulin (TE=0.06-6.07 $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol peptide}$) (25), casein (0.0025-3.22 $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol peptide}$) (36, 37) and ovotransferrin peptides (0.43-15.47 $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol peptide}$) (38) and
238 lower than values reported for β -lactoglobulin peptides (TE=4.45-7.67 $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol peptide}$) rich
239 in aromatic amino acids such as Tyr and Trp considered as determinants in the radical scavenging
240 activity of food derived peptides (39).

242 Using a dataset of reported ORAC values for peptides containing from 2 to 20 residues, quantitative
243 structure-activity relationship (QSAR) models have revealed that properties of C-terminal regions
244 are more important than those at N-terminal for antioxidant activity (24). Therefore, to ascertain if C-

245 terminal sequences of peptides identified in lentil were the determinants for their antioxidant activity
246 C-terminal heptapeptide residues were synthesized and their antioxidant activity tested (Table 2).
247 Different results were observed with the deletion of the N-terminal region for each peptide. Peptides
248 Ct-1, Ct-5 and Ct-9 showed a significantly lower antioxidant activity than their parent peptides 1, 5
249 and 9 ($P < 0.05$) indicating that amino acids at N-terminal regions are also contributing to the
250 antioxidant activity of parent peptides. In contrast, Ct-2 showed similar ORAC values than peptide 2,
251 whereas Ct-3 and Ct-6 showed values more than 2-fold higher than their parent peptides 3 and 6
252 ($P < 0.05$). These results indicate that for peptides 2, 3 and 6, the N-terminal region is less important
253 for antioxidant activity as it has been previously described using QSAR models (24).

254 The analysis of amino acids by the ORAC method in earlier studies have indicated that several
255 amino acids have antioxidative properties in the following order which increases when they are
256 incorporated into peptides, namely Trp>Tyr>Met>Cys>His>Phe (38, 40). These amino acids act as
257 hydrogen donors neutralizing peroxy radicals by the formation of more stable phenoxyl radicals in
258 the ORAC assay (41, 42). His (H) has been also commonly associated with antioxidant activity due
259 to its hydrogen-donating and radical-trapping imidazole ring (43). The presence of Tyr or His in
260 peptides 3, 5, and in their C-terminal heptapeptide sequences, together with Ct-7 may account for
261 their higher antioxidant activity.

262 Moreover, it has been found that key sequence positions are significant for antioxidant activity of
263 food-derived peptides. Studies focused on antioxidant peptides-derived from egg and dairy proteins
264 support the importance of bulky hydrophobic amino acids (Trp, Tyr, Ile, Leu, Met, Phe) in the
265 sequence at C₃ when antioxidant activity is measured by ORAC assay (38, 39, 41). Similarly, QSAR
266 models have indicated that the stericity of bulky amino acids at position C₄, N₂ and C₃ is related
267 positively to antioxidant activity (24). Considering the C-terminal seven residues peptides, it can be
268 observed that lentil derived peptides presented several bulky residues, not always in these positions,
269 although in general there is one at C₄ and three of them have a bulky group at N₂.

270 **ACE inhibitory activity of lentil-derived peptides.** ACE inhibitory activity (IC_{50} value) of
271 synthesized lentil-derived peptides is reported in Table 2. Peptides 1 and 6-12 showed no inhibitory
272 activity in the concentration range tested ($IC_{50} > 250-500 \mu\text{M}$). Peptide 3 showed the most potent
273 activity ($77 \mu\text{M}$) followed by peptides 2 and 5 with similar IC_{50} values ($118.8 \mu\text{M}$ on average).
274 Potency of these peptides was higher than values reported for pea dipeptides ($2.25-7.23 \text{ mM}$) and
275 similar or within the range reported in the literature for common bean ($17.5-191.5 \mu\text{M}$), mushroom
276 ($115-129 \mu\text{M}$) and hemp seed ($27-574 \mu\text{M}$) peptides (14, 44, 45). The ability of these peptides to
277 inhibit ACE is consistent with an earlier study showing that hydrophobic or aromatic amino acid
278 residues or proline at the C-terminus positively contributed to the improvement of ACE inhibitory
279 potency (21). This previous study also concluded that C-terminal tetrapeptide residues for long-chain
280 peptides containing from 4 to 10 residues is more important for their potency than C-terminal
281 tripeptide, indicating the relevance of the fourth amino acid residue. Other study found that C-
282 terminal pentapeptide is critical for ACE inhibitory activity (22), however, exact length of C-
283 terminal region to efficiently inhibit ACE activity is still unknown. According to this information, C-
284 terminal heptapeptide of lentil-derived peptides was synthesized and their ACE inhibitory activity
285 was analyzed (Table 2). Deletion of the N-terminal region significantly increased the potency of all
286 lentil-peptides which confirmed findings from previous studies (11, 21, 23). The most active C-
287 terminal heptapeptides were Ct-3 ($15 \mu\text{M}$), Ct-5 ($25.7 \mu\text{M}$) and Ct-1 ($51.7 \mu\text{M}$).

288 Required amino acids in the C-terminal region of long peptides for strong ACE inhibitory activity
289 have been reported using structure-activity modelling studies (22, 46); however, there are still major
290 differences in key amino acid positions which may be due to variations in modeling tools and peptide
291 databases. There is some agreement with regard to the presence of a positively charge, bulky
292 hydrophobic and aromatic amino acid residues in the C-terminal tetrapeptide, requirements that are
293 completely fulfilled for peptides Ct-3 and Ct-5 and are consistent with their higher potencies.
294 Furthermore, on the basis of other studies, the presence of a branched-chain chain aliphatic amino

295 acid such as Leu at the N-terminal region could has also been responsible for the higher potency of
296 Ct-3 compared to Ct-5.

297 **Effect of gastrointestinal digestion on antioxidant and ACE inhibitory activity of lentil**
298 **peptides.**

299 Bioactive peptides must resist functional inactivation by gastrointestinal enzymes to reach their
300 target organs and tissues and exert their beneficial effects *in vivo*. Because potential antioxidant and
301 antihypertensive activities of peptides is dependent on amino acid composition and sequence, the
302 loss of amino acid residues as a result of proteolysis within the gastrointestinal tract can lead to
303 reduced or increased potency or complete loss activity. To confirm the gastrointestinal stability,
304 lentil-derived peptides were treated *in vitro* with pepsin followed by pancreatin at 37°C under
305 appropriate pH conditions. A comparison of the antioxidant and ACE inhibitory activity of peptides
306 before and after simulated gastrointestinal digestion (SGD) is shown in Table 3. In general, the
307 action of digestive enzymes increased the antioxidant and ACE inhibitory activity of lentil-derived
308 peptides. These results indicate that besides undigested peptides, other smaller fragments and their
309 combined action could contribute to the biological activity of gastrointestinal digests. Our results are
310 in agreement with our previous studies showing increased antioxidant and ACE inhibitory activities
311 of Savinase hydrolysates obtained from lentil after gastrointestinal digestion (19, 47). It is
312 noteworthy to mention the potent dual activities observed in digests obtained from peptides 1, 2, 3
313 and 5 (TE=9.66-14.29 $\mu\text{mol Trolox}/\mu\text{mol peptide}$; IC_{50} =11.4-21.25 μM). Antioxidant activity of
314 gastrointestinal digests was notably higher than values reported for casein (TE=1.38-4.16 μmol
315 $\text{Trolox}/\mu\text{mol peptide}$) and amaranth (0.06-6 $\mu\text{mol Trolox}/\mu\text{mol peptide}$) peptides derived from
316 gastrointestinal digestion (25, 37). Similarly, ACE inhibitory potency was found within the range of
317 reported values for potent plant protein derived peptides (IC_{50} =10-50 μM) (11).

318 **Molecular docking studies.** In order to get insights into the binding mode of the peptides to ACE
319 molecular docking studies have been carried out for the most active C-terminal heptapeptides Ct-1,

320 Ct-3 and Ct-5 as our results indicated that this region is the most important for ACE inhibition. We
321 performed docking studies using two different reported crystal structures of the C-domain sACE, one
322 in complex with the vasoactive octapeptide angiotensin II (AngII, Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe)
323 and another in complex with an eleven amino acid inhibitor, bradykinin potentiating peptide (BPPb,
324 pGlu-Gly-Leu-Pro-Pro-Arg-Pro-Lys-Ile-Pro-Pro), pdb codes 4APH and 4APJ, respectively (30). In
325 the structure of ACE bound to BPPb, the binding of BPPb caused the elimination of the zinc ion, and
326 it is observed significant conformation changes compared with the enzyme in complex with AngII,
327 which is interesting for docking studies as two different conformation of the active site are been
328 considered.

329 The initial docking of the peptides in ACE was done using the induced fit docking protocol of the
330 Schrödinger suite (27-29). This protocol allows considering side chain flexibility of residues around
331 5 Å from the ligand. Various parameters as IFD score, and visual inspection were used to select
332 those conformations that best match the enzyme binding-site. Interestingly a better complementarity
333 was obtained when the docking was carried out using the protein conformation derived from ACE-
334 BPPb complex. However, these models have a limitation as only partially side chain flexibility has
335 been considered, to overcome this limitation and to allow the flexibility of the whole protein,
336 molecular dynamics studies were applied to refine these ACE-peptide complex models. Explicit-
337 solvent molecular dynamics simulations were carried out using Amber, the force field ff12SB and
338 the TIP3 water model (31, 32). After the first equilibration steps in which positional restrains were
339 applied, it was allowed the flexibility of both the enzyme and the peptides, in order to optimize the
340 interactions between them. The analysis of the final models revealed a series of key residues of ACE
341 for the interaction with the peptides, several of them were also involved in the binding of AngII or
342 BPPb.

343 Molecular docking studies have revealed that Ct-1, Ct-3 and Ct-5 occupied the same location in the
344 active site of ACE as AngII or bradykinin, with a similar orientation of the N- and C-terminus, and

345 sharing important residues for the interaction, principally with S2' subsite. These heptapeptides
346 showed more interactions with the enzyme toward the C-terminus. In particular, there are several
347 hydrogen bonds that are maintained through the dynamic studies involving the C-terminal carboxylic
348 group of peptides Ct-1, Ct-3 and Ct-5, and the sidechains of two ACE residues, namely Tyr520 and
349 Lys511, besides derivatives Ct-3 and Ct-5 also showed a hydrogen bond with NH₂ sidechain group
350 of Gln281. These three ACE residues are also involved in the binding of AngII and BPPb. It is also
351 interesting to note that the amino terminus of these three peptides is involved in hydrogen bonds,
352 with the sidechain of Glu403 for peptides Ct-3 and Ct-5, a residue also involved in the binding of
353 BPPb, whereas for peptide Ct-1 there is a hydrogen bond to Asp358, a residue implicated in the
354 interaction with AngII. Besides, each peptide is further stabilized with additional hydrogen bonds
355 and hydrophobic interactions, as detailed below.

356 Peptide Ct-1 is anchor to the enzyme through a network of hydrogen bonds in which almost all
357 amino acids are implicated (Figure 1B), as the ones that engaged the backbone CO of Pro1 and Leu4,
358 the former interacts through two hydrogen bonds with Asp358 of ACE, the latter with His513 side
359 chain. The side chain of the third residue (Gln3) forms hydrogen bonds with the side chains of ACE
360 Asn66 and Trp357. Additionally, Ser6 of the peptide Ct-1 is involved in two hydrogen bonds with
361 the Glu411 sidechain. The next residue, Phe7, is stabilized by a π -interaction with Tyr523, as well is
362 within a binding pocket with two other aromatic residues Phe457, Phe527. A special mention
363 deserves the two interaction of the NH₂ group of Gln5 sidechain with ACE, namely a hydrogen bond
364 with the carbonyl of Ala354, and a NH- π interaction with His353 sidechain. The Gln5 residue is
365 substituted in peptide 6 with a Glu, and this replacement leads to a considerable decrease in ACE
366 inhibition. Thus, the mentioned interactions of the sidechain of Gln5 might account for the higher
367 affinity of peptide Ct-1 compared with Ct-6.

368 Peptide Ct-3 was the one with the higher affinity for ACE (this C-heptapeptide sequence is also share
369 for peptide 9). There are fewer interactions in the N-terminus, among them hydrogen bonds

370 involving the Leu1 amino group and the sidechain of Glu403, as well as several hydrophobic
371 interactions, thus, Leu1 of Ct-3 is close to Phe352, and Pro2 to Trp59, Tyr62 and Tyr360. On the
372 contrary the C-terminal tripeptide fragment (RYL) is strongly anchored to the enzyme through ionic
373 π - π interactions and hydrogen bonds. Thus, it is observed a good electrostatic complementarity
374 between the binding pocket and the charged residues, in particular salt bridges are presented between
375 the sidechain of Arg5 and the COO terminal group of Ct-3 and Glu143 and Lys511 sidechains of
376 ACE, respectively. The Leu7 residue binds in the S2' subsite through a series of hydrogen bond
377 involving its C-terminal group and the sidechains of Lys511, Tyr520 and Gln281 of ACE. The
378 hydrogen bond with Lys511 is frequently bifurcated. Tyr6 residue of Ct-3 shows a hydrogen bond
379 between the NH of the backbone and the CO of Ala354 of ACE, this hydrogen bond was also
380 observed in the X-ray structure 4APH, with a backbone NH of AngII. The sidechain of Tyr6 is also
381 stabilized through hydrophobic interactions, in particular, π - π interactions with Tyr523, and it is
382 surrounded by Phe457 and Phe527. Besides, Arg5 residue forms a bifurcated hydrogen bond
383 between the NHNH_2 of the guanidinium group and Glu143 of ACE, a hydrogen bond with Phe512
384 and likely with Ser516. Additionally, it is observed a stacking between the guanidinium group and
385 Phe512, it has been described that the geometry of this stacking allows a cation- π interaction, as well
386 as additional non electrostatic van der Waals and π - π interactions. On the whole, there is a network
387 of hydrogen bonds that stabilized the C-terminal tripeptide RYL, reinforced by stacking with
388 aromatic rings. This strong interaction is in agreement with the fact that this sequence has been found
389 in a series of peptides with capacity to inhibit ACE (BIOPEP database). It is interesting to note that
390 N-terminal sequence of peptide Ct-7 RLL, differs from that of peptide Ct-3, in that the residue of
391 Tyr6 has been replaced by Leu6 and its inhibition is considerable lower, one of the factors that may
392 influence this lower inhibition is the loss of the stacking between the aromatic ring of Tyr523 of
393 ACE and the Tyr6 of peptide Ct-3.

394 Peptide Ct-5 is anchor to ACE thought the already mentioned hydrogen bonds involving the C and
395 N-terminus residues. Besides, the main chain of peptide Ct-5 is stabilized by further hydrogen bonds,
396 as the one between CO of Leu5 and ACE His513 sidechain, as well as between Val4 NH and
397 backbone CO of ACE Ala356 (Figure 1C). These residues of ACE are also involved in hydrogen
398 bonds with AngII and BPPb. This peptide is additional stabilized through a series of hydrophobic
399 contacts. Thus, Phe1 and Leu2 are surrounded by a cluster of aromatic residues, namely Trp59,
400 Tyr62 and Tyr360. The Pro3 residue is situated very similar to the Pro7 of BPPb and is also
401 stabilized by hydrophobic interactions with Trp357 from the enzyme, as well Leu5 is located close to
402 Phe512. Finally, Leu6 is also within a binding pocket delimited by tyrosines 520 and 523, and
403 phenylalanines 457 and 527.

404 During the last years, it has become apparently that ACE is involved in other physiological processes
405 outside blood regulation and that its C and N-domain are involved in divergent biological processes
406 (30, 48, 49). The C-domain has been shown to process angiotensin I more efficiently than the N-
407 domain, while angiotensin 1-7, β -amyloid 1-42 or peptide AcSDKP are better hydrolyzed by the N-
408 domain, finally both hydrolyze bradykinin with similar efficiency. Thus, there is an interest in C-
409 domain selective inhibitors, in order to provide control of blood pressure, and the same time to allow
410 an active N-domain. There has been described several inhibitors with selectivity for the C- or N-
411 domain, and their selectivity has been explained on the base of key residues that differ between the
412 two domains (49). It is worth mentioning Glu403 residue of C-ACE is replaced by an Arg (Arg381)
413 in N-ACE, this residue being involved in the binding of Ct-3 and Ct-5, which might suggested a
414 certain selectivity of these two peptides for the C-domain over the N-domain.

415 **Final remarks.** In this study, we have demonstrated that fragments from lentil storage proteins
416 vicilin, convicilin and legumin with dual antioxidant and ACE inhibitory. Gastrointestinal digestion
417 of lentil-derived peptides improved markedly their dual activity suggesting their promising potential
418 to exert antihypertensive properties *in vivo*. Electronic, hydrophobic and steric properties of amino

419 acid residues in the C-terminal region were important structural features of peptides for higher
420 antioxidant properties while positively charged amino acids and hydrophobic amino acid residues are
421 determinant for higher ACE inhibitory potency. In addition, molecular docking studies have revealed
422 that C-terminal heptapeptide residues of lentil-derived peptides interact by hydrogen bonds with
423 three ACE residues of the catalytic site also involved in the binding of AngII and BPPb (Tyr520 and
424 Lys511 and Gln281). All this information encourages future research efforts on using lentil
425 hydrolysates or purified peptide fractions to reduce blood pressure in preclinical and clinical studies.

426

427 **AUTHOR INFORMATION**

428 **Corresponding author**

429 Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006,
430 Madrid, Spain. Tel.: + 34 912587601. E-mail: c.m.villaluenga@csic.es (C. Martinez-Villaluenga).

431 **Funding**

432 This work has received financial support (project AGL2010-16310, AGL2013-43247-R and
433 BFU2012-39092-C02-02) from Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO, Spain) and
434 FEDER programme from the European Commission. E. P. and P. G-M. Acknowledge Ministry of
435 Economy and Competitiveness for their “Ramón y Cajal” and FPI contract, respectively.

436 **Notes**

437 Authors declare no competing financial interest.

438 **REFERENCES**

- 439 1. Levi, F.; Lucchini, F.; Negri, E.; La Vecchia, C., Trends in mortality from cardiovascular and
440 cerebrovascular diseases in Europe and other areas of the world. *Heart* **2002**, *88*, 119-124.
- 441 2. Natesh, R.; Schwager, S. L.; Sturrock, E. D.; Acharya, K. R., Crystal structure of the human
442 angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature* **2003**, *421*, 551-4.

- 443 3. Pacurari, M.; Kafoury, R.; Tchounwou, P. B.; Ndebele, K., The Renin-Angiotensin-
444 aldosterone system in vascular inflammation and remodeling. *International journal of inflammation*
445 **2014**, 2014, 689360.
- 446 4. Aluko, R. E., Antihypertensive peptides from food proteins. *Annual Review of Food Science*
447 *and Technology* **2015**, 6, 235-262.
- 448 5. Török, J., Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension.
449 *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* **2008**, 57, 813-825.
- 450 6. Harrison, D. G.; Gongora, M. C., Oxidative stress and hypertension. *The Medical clinics of*
451 *North America* **2009**, 93, 621-35.
- 452 7. Sweitzer, N. K., What Is an Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor? *Circulation* **2003**,
453 108, e16-e18.
- 454 8. Abassi, Z.; Winaver, J.; Feuerstein, G. Z., The biochemical pharmacology of renin inhibitors:
455 Implications for translational medicine in hypertension, diabetic nephropathy and heart failure:
456 Expectations and reality. *Biochemical Pharmacology* **2009**, 78, 933-940.
- 457 9. Semen, K.; Yelisyeyeva, O.; Jarocka-Karpowicz, I.; Kaminsky, D.; Solovey, L.;
458 Skrzydlewska, E.; Yavorskyi, O., Sildenafil reduces signs of oxidative stress in pulmonary arterial
459 hypertension: Evaluation by fatty acid composition, level of hydroxynonenal and heart rate
460 variability. *Redox Biology* **2016**, 7, 48-57.
- 461 10. Sardana, M.; Moll, M.; Farber, H. W., Novel investigational therapies for treating pulmonary
462 arterial hypertension. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2015**, 24, 1571-1596.
- 463 11. Aluko, R. E., Structure and function of plant protein-derived antihypertensive peptides.
464 *Current Opinion in Food Science* **2015**, 4, 44-50.
- 465 12. Roy, F.; Boye, J. I.; Simpson, B. K., Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea,
466 chickpea and lentil. *Food Research International* **2010**, 43, 432-442.

- 467 13. Betancur-Ancona, D.; Sosa-Espinoza, T.; Ruiz-Ruiz, J.; Segura-Campos, M.; Chel-Guerrero,
468 L., Enzymatic hydrolysis of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein concentrates and its
469 effects on biological and functional properties. *International Journal of Food Science & Technology*
470 **2014**, *49*, 2-8.
- 471 14. Aluko, R. E.; Girgih, A. T.; He, R.; Malomo, S.; Li, H.; Offengenden, M.; Wu, J., Structural
472 and functional characterization of yellow field pea seed (*Pisum sativum* L.) protein-derived
473 antihypertensive peptides. *Food Research International*.
- 474 15. Barbana, C.; Boye, J. I., Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil
475 protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. *Food Chemistry* **2011**, *127*, 94-101.
- 476 16. Boschin, G.; Scigliuolo, G. M.; Resta, D.; Arnoldi, A., Optimization of the Enzymatic
477 Hydrolysis of Lupin (*Lupinus*) Proteins for Producing ACE-Inhibitory Peptides. *Journal of*
478 *agricultural and food chemistry* **2014**, *62*, 1846-51.
- 479 17. Rui, X.; Boye, J. I.; Simpson, B. K.; Prasher, S. O., Angiotensin I-converting enzyme
480 inhibitory properties of *Phaseolus vulgaris* bean hydrolysates: Effects of different thermal and
481 enzymatic digestion treatments. *Food Research International* **2012**, *49*, 739-746.
- 482 18. Barbana, C.; Boye, J. I., Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of chickpea and
483 pea protein hydrolysates. *Food Research International* **2010**, *43*, 1642-1649.
- 484 19. Garcia-Mora, P.; Peñas, E.; Frias, J.; Martínez-Villaluenga, C., Savinase, the most suitable
485 enzyme for releasing peptides from lentil (*Lens culinaris* var. Castellana) protein concentrates with
486 multifunctional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62*, 4166-4174.
- 487 20. Garcia-Mora, P.; Frias, J.; Peñas, E.; Zieliński, H.; Giménez-Bastida, J. A.; Wiczowski, W.;
488 Zielińska, D.; Martínez-Villaluenga, C., Simultaneous release of peptides and phenolics with
489 antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities from pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.
490 var. pinto) proteins by subtilisins. *Journal of Functional Foods* **2015**, *18*, 319-332.

- 491 21. Wu, J.; Aluko, R. E.; Nakai, S., Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme
492 inhibitory peptides: Quantitative structure-activity relationship modeling of peptides containing 4-10
493 amino acid residues. *QSAR and Combinatorial Science* **2006**, *25*, 873-880.
- 494 22. Sagardia, I.; Roa-Ureta, R. H.; Bald, C., A new QSAR model, for angiotensin I-converting
495 enzyme inhibitory oligopeptides. *Food Chemistry* **2013**, *136*, 1370-1376.
- 496 23. Zhou, P.; Yang, C.; Ren, Y.; Wang, C.; Tian, F., What are the ideal properties for functional
497 food peptides with antihypertensive effect? A computational peptidology approach. *Food Chemistry*
498 **2013**, *141*, 2967-2973.
- 499 24. Li, Y. W.; Li, B., Characterization of structure-antioxidant activity relationship of peptides in
500 free radical systems using QSAR models: Key sequence positions and their amino acid properties.
501 *Journal of Theoretical Biology* **2013**, *318*, 29-43.
- 502 25. Orsini Delgado, M. C.; Nardo, A.; Pavlovic, M.; Rogniaux, H.; Añón, M. C.; Tironi, V. A.,
503 Identification and characterization of antioxidant peptides obtained by gastrointestinal digestion of
504 amaranth proteins. *Food Chemistry* **2016**, *197*, 1160-1167.
- 505 26. Moreno, F. J.; Mellon, F. A.; Wickham, M. S. J.; Bottrill, A. R.; Mills, E. N. C., Stability of
506 the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal
507 digestion. *FEBS Journal* **2005**, *272*, 341-352.
- 508 27. Sherman, W.; Beard, H. S.; Farid, R., Use of an induced fit receptor structure in virtual
509 screening. *Chemical Biology and Drug Design* **2006**, *67*, 83-84.
- 510 28. Sherman, W.; Day, T.; Jacobson, M. P.; Friesner, R. A.; Farid, R., Novel procedure for
511 modeling ligand/receptor induced fit effects. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 534-553.
- 512 29. Schrödinger, L. *Schrödinger Suite 2011 Induced Fit Docking protocol*, Glyde Version 5.7;
513 New York, 2011.

- 514 30. Masuyer, G.; Schwager, S. L. U.; Sturrock, E. D.; Isaac, R. E.; Acharya, K. R., Molecular
515 recognition and regulation of human angiotensin-I converting enzyme (ACE) activity by natural
516 inhibitory peptides. *Scientific Reports* **2012**, *2*.
- 517 31. Pearlman, D. A.; Case, D. A.; Caldwell, J. W.; Ross, W. S.; Cheatham Iii, T. E.; DeBolt, S.;
518 Ferguson, D.; Seibel, G.; Kollman, P., AMBER, a package of computer programs for applying
519 molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to
520 simulate the structural and energetic properties of molecules. *Computer Physics Communications*
521 **1995**, *91*, 1-41.
- 522 32. Case, D. A., Darden, T.A., Cheatham, T.E., Simmerling, C.L., Wang, J., Duke, R.E., Luo,
523 R., Walker, R.C., Zhang, W., Merz, K.M., Roberts, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Swails,
524 J., Götz, A.W., Kolossváry, I., Wong, K.F., Paesani, F., Vanicek, J., Wolf, R.M., Liu, J., Wu, X.,
525 Brozell, S.R., Steinbrecher, T., Gohlke, H., Cai, Q., Ye, X., Wang, J., Hsieh, M.-J., Cui, G., Roe,
526 D.R., Mathews, D.H., Seetin, M.G., Salomon-Ferrer, R., Sagui, C., Babin, V., Luchko, T., Gusarov,
527 S., Kovalenko, A., Kollman P.A., AMBER 12. *University of California, San Francisco* **2012**.
- 528 33. *The Pymol Molecular Graphic System*, version 1.7.0.1; Schrödinger, LLC.
- 529 34. Gupta, R.; Beg, Q. K.; Khan, S.; Chauhan, B., An overview on fermentation, downstream
530 processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology*
531 **2003**, *60*, 381-395.
- 532 35. Craft, B. D.; Kerrihard, A. L.; Amarowicz, R.; Pegg, R. B., Phenol-Based Antioxidants and
533 the In Vitro Methods Used for Their Assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food*
534 *Safety* **2012**, *11*, 148-173.
- 535 36. Contreras, M. d. M.; Carrón, R.; Montero, M. J.; Ramos, M.; Recio, I., Novel casein-derived
536 peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal* **2009**, *19*, 566-573.

- 537 37. Contreras, M. D. M.; Sanchez, D.; Sevilla, M. T.; Recio, I.; Amigo, L., Resistance of casein-
538 derived bioactive peptides to simulated gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal* **2013**,
539 32, 71-78.
- 540 38. Shen, G.; Chahal, B.; Majumder, K.; You, S. J.; Wu, J., Identification of novel antioxidative
541 peptides derived from a thermolytic Hydrolysate of ovotransferrin by LC-MS/MS. *Journal of*
542 *Agricultural and Food Chemistry* **2010**, 58, 7664-7672.
- 543 39. Hernández-Ledesma, B.; Amigo, L.; Recio, I.; Bartolomé, B., ACE-inhibitory and radical-
544 scavenging activity of peptides derived from β -lactoglobulin f(19-25). Interactions with ascorbic
545 acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, 55, 3392-3397.
- 546 40. Saito, K.; Jin, D. H.; Ogawa, T.; Muramoto, K.; Hatakeyama, E.; Yasuhara, T.; Nokihara, K.,
547 Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *Journal of*
548 *Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51, 3668-3674.
- 549 41. Hernández-Ledesma, B.; Miralles, B.; Amigo, L.; Ramos, M.; Recio, I., Identification of
550 antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *Journal of the Science of Food and*
551 *Agriculture* **2005**, 85, 1041-1048.
- 552 42. Dávalos, A.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B., Extending Applicability of the Oxygen
553 Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *Journal of Agricultural and Food*
554 *Chemistry* **2004**, 52, 48-54.
- 555 43. Elias, R. J.; Kellerby, S. S.; Decker, E. A., Antioxidant activity of proteins and peptides.
556 *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2008**, 48, 430-441.
- 557 44. Luna-Vital, D. A.; Gonzalez de Mejia, E.; Mendoza, S.; Loarca-Pina, G., Peptides present in
558 the non-digestible fraction of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) inhibit the angiotensin-I
559 converting enzyme by interacting with its catalytic cavity independent of their antioxidant capacity.
560 *Food & function* **2015**, 6, 1470-9.

- 561 45. Lau, C. C.; Abdullah, N.; Shuib, A. S.; Aminudin, N., Novel angiotensin I-converting
562 enzyme inhibitory peptides derived from edible mushroom *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach
563 identified by LC–MS/MS. *Food Chemistry* **2014**, *148*, 396-401.
- 564 46. Aluko, R. E.; Girgih, A. T.; He, R.; Malomo, S.; Li, H.; Offengenden, M.; Wu, J., Structural
565 and functional characterization of yellow field pea seed (*Pisum sativum* L.) protein-derived
566 antihypertensive peptides. *Food Research International* **2015**, *77*, 10-16.
- 567 47. Garcia-Mora, P.; Peñas, E.; Frias, J.; Gomez, R.; Martinez-Villaluenga, C., High-pressure
568 improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin i converting enzyme
569 inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins. *Food Chemistry* **2015**, *171*, 224-232.
- 570 48. Bernstein, K. E.; Ong, F. S.; Blackwell, W. L. B.; Shah, K. H.; Giani, J. F.; Gonzalez-
571 Villalobos, R. A.; Shen, X. Z.; Fuchs, S., A modern understanding of the traditional and
572 nontraditional biological functions of angiotensin-converting enzyme. *Pharmacological Reviews*
573 **2013**, *65*, 1-46.
- 574 49. Harrison, C.; Acharya, K. R., ACE for all – a molecular perspective. *Journal of Cell*
575 *Communication and Signaling* **2014**, *8*, 195-210.

576

577 **FIGURE CAPTIONS**

578 **Figure 1.** A. Cartoon representation of the superposition of the models of the C-domain of ACE in
579 complex with peptide Ct-1 (C atoms in purple), Ct-3 (C atoms in cyan) or Ct-5 (C atoms in green),
580 peptides in stick representation. B. Residues of ACE interacting with peptide Ct-1. C. Residues of
581 ACE interacting with peptide Ct-3. D. Residues of ACE interacting with peptide Ct-5. For clarity
582 only polar hydrogens are shown.

Table 1. Most abundant peptides identified in lentil hydrolysates produced by enzymatic hydrolysis with Savinase® 16 L.

Code	Sequence	Parent proteins	Molecular mass ¹	Observed mass	Calculated mass	Ion m/z	Charge
1	DLAIPVNRPGQLQSF	Vicilin Allergen Len c 1.0101	1882.9	1654.89	1653.88	827.45	2
2	LLSGTQNQPSFLSGF	Allergen Len c 1.0101 Allergen Len c 1.0102	1710.8	1595.81	1597.80	797.91	2
3	NSLTLPIRLYL	Legumin type B beta chain	1530.1	1302.78	1301.77	651.39	2
5	TLEPNSVFLPVLLH	Vicilin-like antimicrobial peptides 2-3	1692.9	1578.89	1577.88	789.45	2
6	DLAIPVNNPGQLESF	Allergen Len c 1.0102	1727.8	1613.82	1612.80	806.91	2
7	RFQTIYNENGHIRLL	Allergen Len c 1.0101 Allergen Len c 1.0102	2117.2	2003.04	2000.03	667.68	3
9	LVNEGKGNLELVGF	Convicilin	1716.7	1488.81	1488.68	744.41	2
12	EITPEKNPQLQDLDFVN	Allergen Len c 1.0101 Allergen Len c 1.0102 Vicilin	2341.4	2113.08	2112.07	1056.54	2

¹Molecular mass expressed in g/mol

Table 2. Antioxidant and ACE inhibitory (ACEI) activities of complete and C-terminal heptapeptide sequence of identified peptides in lentil protein hydrolysates

Code	Number of aa	Peptide	Molecular mass ¹	ORAC ^{2,4}	ACEI ^{3,4}
Complete sequence					
1	15	DLAIPVNRPGQLQSF	1882.9	0.015±0.001aB	>500
2	15	LLSGTQNQPSFLSGF	1710.8	0.013±0.000aA	119.75±3.04bB
3	11	NSLTLPIRLYL	1530.1	1.432±0.068cA	77.14±2.31aB
5	14	TLEPNSVFLPVLLH	1692.9	0.139±0.005bB	117.81±8.92bB
6	15	DLAIPVNNPGQLESF	1727.8	0.004±0.000aA	>300
7	16	RFQTIYENENGHIRLL	2117.2	Nm ⁵	>250
9	14	LVNEGKGNLELVGF	1716.72	0.009±0.000aB	>500
12	17	EITPEKNPQLQDLDFVN	2341.4	0.049±0.002a	>500
C-terminal heptapeptide sequence					
Ct 1	7	PGQLQSF	889.9	0.006±0.000aA	51.75±1.03ab
Ct 2	7	PSFLSGF	789.9	0.015±0.001aB	74.03±0.42bA
Ct 3	7	LPIRLYL	1115.2	2.521±0.207bB	14.99±0.07aA
Ct 5	7	FLPVLLH	952.5	0.086±0.012aA	25.66±0.36abA
Ct 6	7	PGQLESF	890.85	0.011±0.001aB	377.30±29.13d
Ct 7	7	NGHIRLL	1050.0	0.035±0.006a	244.85±6.43c
Ct 9	7	NLELVGF	904.9	0.006±0.000aA	342.40±49.21d
Ct 12	7	DLDFVN	834.9	nm	nm

¹ Molecular mass expressed in g/mol

² ORAC of peptides expressed as Trolox equivalents ($\mu\text{mol Trolox}/\mu\text{mol pure peptide}$)

³ ACEI of peptides expressed as IC₅₀ (concentration of peptide in μM needed to inhibit ACE activity by 50%)

⁴ Lowercase letters indicate statistical differences among complete or C-terminal heptapeptide sequences ($p < 0.05$, Duncan test). Uppercase letters indicate differences between each C-terminal heptapeptide and its parent sequence ($p < 0.05$, Duncan test).

⁵ nm, not measured

Table 3. Functional stability of peptides identified in lentil protein hydrolysates to simulated gastrointestinal digestion (SGD)

Code	Sequence	ORAC ^{1,3}		ACEI ^{2,3}	
		Before SGD ⁴	After SGD	Before SGD	After SGD
1	DLAIPVNRPGQLQSF	0.015±0.001aA	10.87±0.89aB	>500	11.4±0.78a
2	LLSGTQNQPSFLSGF	0.013±0.000aA	14.29±1.65cB	119.75±3.04bB	21.25±1.17cA
3	NSLTLPIRLYL	1.432±0.068cA	9.66±0.02aB	77.14±2.31aB	20.475±0.52cA
5	TLEPNSVFLPVLLH	0.139±0.005bA	12.59±1.42bB	117.81±8.92bB	16.045±0.95bA
6	DLAIPVNNPGQLESF	0.004±0.000aA	9.65±1.24aB	>300	>100
7	RFQTIYENENGHIRLL	nm ⁵	9.85±1.20a	>250	74.54±0.52d
9	LVNEGKGNLELVGF	0.009±0.000aA	16.61±1.59dB	>500	>100
12	EITPEKNPQLQDLDFVN	0.049±0.002aA	10.28±1.29aB	>500	>100

¹ ORAC of peptides expressed as $\mu\text{mol Trolox}/\mu\text{mol pure peptide}$

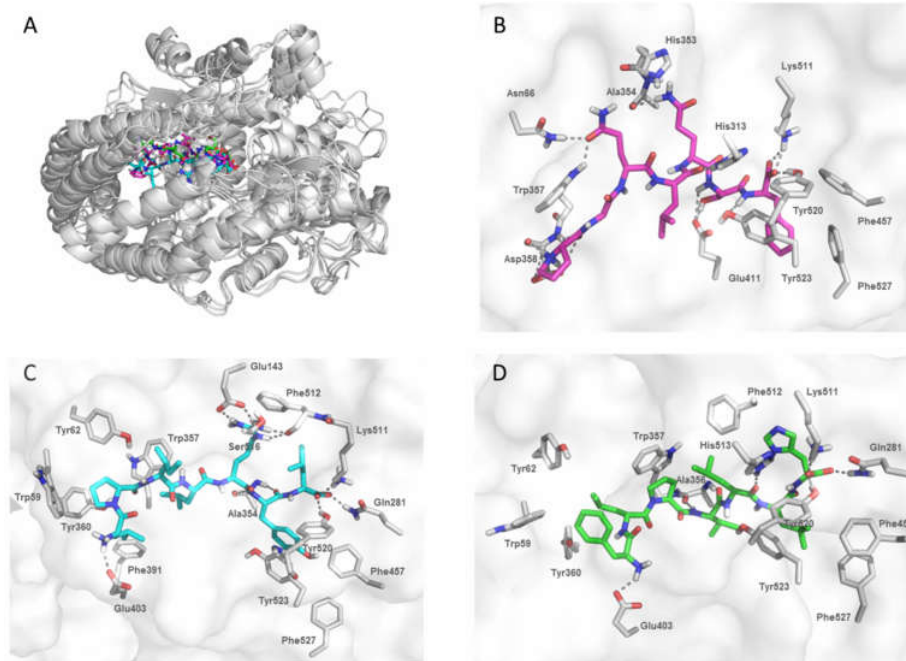
² ACEI of peptides expressed as IC_{50} (concentration of peptide in μM needed to inhibit ACE activity by 50%)

³ Lowercase letters indicate statistical differences among values within a column ($p < 0.05$, Duncan test). Uppercase letters indicate differences between treatments for each biological activity ($p < 0.05$, Duncan test).

⁴ SGD, simulated gastrointestinal digestion

⁵ nm, not measured

Figure 1



Publicación III: Liberación simultánea de compuestos fenólicos y péptidos con actividades antioxidante, IECA y anti-inflamatoria a partir de proteínas de judía (*Phaseolus vulgaris* L. var. pinto) mediante el empleo de subtilisinas.

Patricia García-Mora, Juana Frías, Elena Peñas, Henryk Zielinski, Juan Antonio Giménez-Bastida, Wiesław Wiczkowski, Danuta Zielinska, Cristina Martínez-Villaluenga. Simultaneous release of peptides and phenolics with antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities from pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. pinto) proteins by subtilisins. *Journal of Functional Foods*, 2015, 18: 319-332.

RESUMEN

La producción de nuevos ingredientes funcionales a partir de proteínas de leguminosas es una estrategia valiosa para fomentar su consumo y su empleo en la industria alimentaria. Con el fin de explorar las propiedades funcionales de los hidrolizados de judía pinta, en el presente trabajo se evaluó la eficacia de dos subtilisinas (Alcalasa y Savinasa) para obtener una liberación simultánea de compuestos fenólicos y péptidos con actividades antioxidante, inhibidora de la ECA (IECA) y anti-inflamatoria a partir de proteínas de judía. La Alcalasa mostró la mayor eficiencia proteolítica, observándose un aumento significativo de la liberación de péptidos de pequeño tamaño (< 3 kDa) tras la hidrólisis durante 120 min. En cambio, la hidrólisis con Savinasa durante 90 min causó un aumento del contenido de ácidos hidroxicinámicos y flavonoides, debido a su mayor actividad esterasa. Los hidrolizados más activos (obtenidos con Savinasa y Alcalasa a los 90 y 120 min, respectivamente), presentaron elevada actividad para atrapar radicales libres (326-348 mmoles TE/g), IECA (IC_{50} = 0,22-0,26 mg/mL) y anti-inflamatoria (28-16% de inhibición). La caracterización de los péptidos contenidos en estos hidrolizados confirmó la presencia de secuencias bioactivas derivadas de la faseolina. Estos resultados evidencian el enorme potencial de los hidrolizados de judía pinta como ingredientes funcionales para la elaboración de alimentos saludables.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jff

Simultaneous release of peptides and phenolics with antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities from pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. pinto) proteins by subtilisins

Patricia Garcia-Mora ^a, Juana Frias ^a, Elena Peñas ^a, Henryk Zieliński ^b,
 Juan Antonio Giménez-Bastida ^b, Wiesław Wiczkowski ^b,
 Danuta Zielińska ^c, Cristina Martínez-Villaluenga ^{a,*}

^a Department of Characterization, Quality and Safety, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Juan de la Cierva 3, Madrid 28006, Spain

^b Division of Food Science, Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences, Tuwima 10, P.O. Box 55, 10-748 Olsztyn, Poland

^c Department of Chemistry, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Plac Lodzki 4, 10-727 Olsztyn, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 April 2015

Received in revised form 8 July 2015

Accepted 10 July 2015

Available online

Keywords:

Pinto bean

Proteolysis

Bioactive peptides

Phenolic compounds

Biological activity

ABSTRACT

Production of novel functional ingredients from legume proteins is a valuable strategy to boost their food use and intake. Aimed at a better exploitation of the functional properties of pinto bean hydrolysates, the effectiveness of two subtilisins (Alcalase and Savinase) for the simultaneous release of bioactive peptides and phenolics with antioxidant, angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory and anti-inflammatory activities was investigated. A higher proteolytic efficiency was observed for Alcalase that increased the concentration of small peptides in hydrolysates after 120 min. Savinase improved hydroxycinnamic acids and flavonoid contents in hydrolysates after 90 min due to its higher esterase activity. The most active hydrolysates combined potent free radical scavenging (326–348 mmol TE/g), ACE inhibitory ($IC_{50} = 0.22\text{--}0.26$ mg/mL) and anti-inflammatory (28–16% inhibition) activities. Peptide characterization of active hydrolysates confirmed the presence of bioactive fragments derived from phaseolin. These results evidence the promising potential of pinto bean hydrolysates as functional ingredients in the design of healthy foods.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Department of Characterization, Quality and Safety, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Juan de la Cierva 3, Madrid 28006, Spain. Tel.: +34 91 2587601; fax: +34 5644853.

E-mail address: c.m.villaluenga@csic.es (C. Martínez-Villaluenga).

Abbreviations: AAE, Ascorbic acid equivalents; ABTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulphonate); ACE, Angiotensin I converting enzyme; CAE, Catechin equivalents; CV, cyclic voltammetry; CVD, Cardiovascular diseases; DW, Dry weight; FAE, Ferulic acid equivalents; FRAP, Ferric reducing antioxidant power; HAT, hydrogen atom transfer; ET, Electron transfer; IL-1 β , Interleukin1 β ; IL-6, Interleukin 6; ORAC, Oxygen radical absorbance capacity; SDS-PAGE, Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis; TE, Trolox equivalents; TP, Total phenolics; TF, Total flavonoids

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.07.010>

1756-4646/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) are the biggest cause of global mortality (World Health Organization, 2014). Raised blood pressure (hypertension) is a major cardiovascular risk factor that has been considered as a key target for controlling CVD-related mortality and improving global health. Healthy diets consisting of low sodium and unsaturated fat intake as well as increased consumption of fruits, vegetables and legumes have shown a high impact for reducing the prevalence of hypertension (World Health Organization, 2015).

Nutritionally, legumes are recognized as a good source of proteins, starch, dietary fibre, minerals and vitamins (Vaz Patto et al., 2015). Legume consumption has been associated to the prevention of CVD (Arnoldi, Zanoni, Lammi, & Boschini, 2015; Rebello, Greenway, & Finley, 2014). Positive health effects of legumes on CVD prevention have been ascribed to the presence of a variety of naturally occurring bioactive compounds. Legume proteins are sources of bioactive peptides exhibiting blood pressure-lowering (angiotensin I converting enzyme (ACE)-inhibitory), anti-inflammatory and antioxidant activities once released upon gastrointestinal digestion or enzymatic treatments that may occur during food processing (López-Barríos, Gutiérrez-Urbe, & Serna-Saldívar, 2014). Legumes are also rich in phenolic compounds ranging from 1.1 to 68 mg/g of dry weight (Vaz Patto et al., 2015). Phenolic acids and flavonoids are the most abundant phenolics in legumes and they generally occur as free and bound forms, the latter representing up to 50% of the total phenolic content (Gutiérrez-Urbe, Romo-Lopez, & Serna-Saldívar, 2011; Yeo & Shahidi, 2015). Scientific data evidence the potential of polyphenols to improve cardiovascular health through an array of actions including antioxidant, anti-inflammatory, antihypertensive and anti-atherosclerotic activities (Del Rio et al., 2013). Bioactivities and bioavailability of plant polyphenols may be affected by interactions between these compounds and food matrix components (Wang, He, & Chen, 2014). Some processing technologies such as germination, fermentation and enzymatic treatments (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe, & Serna-Saldívar, 2014) have been evaluated to avoid these disadvantages increasing soluble to bound phenolics ratio.

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most important legume specie besides soybean in terms of economic value and represents one third of the total world production of pulses (22.5 Mt/year) (FAOSTAT, 2013). Common beans have received increased attention because of their beneficial physiological effects in reducing cardiometabolic risk factors and a broad range of chronic diseases (Hayat, Ahmad, Masud, Ahmed, & Bashir, 2014). Dry beans are the staple food of many countries in America and Asia; however, despite their nutritional value and beneficial effects common beans are largely under-exploited and their worldwide consumption is declining (Kohajdová, Karovičová, & Magala, 2013). In this context, one valuable approach to enhance common bean intake and uses is their application in the design of novel and healthy foods.

Aimed at a better exploitation of legume food products, production of functional hydrolysates containing bioactive peptides from legume seed storage proteins is a topic of great scientific interest (García-Mora, Peñas, Frias, Gomez, &

Martínez-Villaluenga, 2015; Luna Vital, González De Mejía, Dia, & Loarca-Piña, 2014; Torruco-Uco, Chel-Guerrero, Martínez-Ayala, Dávila-Ortiz, & Betancur-Ancona, 2009; Valdez-Ortiz, Fuentes-Gutiérrez, Germán-Báez, Gutiérrez-Dorado, & Medina-Godoy, 2012). However, the effect of proteolysis on the release of bound phenolics and how phenolic compounds contribute to the bioactivity of legume hydrolysates have been unexplored. In this study, we examine the effectiveness of two proteases from *Bacillus* spp. (also known as subtilisins) to release bioactive peptides and phenolic compounds with antioxidant, ACE inhibitory, and anti-inflammatory activities from pinto bean (*P. vulgaris* var. pinto) proteins.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and materials

DC (detergent compatible) protein assay reagents were purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). Tripeptide Abz-Gly-Phe(NO₂)-Pro was purchased from Cymit-Química (Barcelona, Spain). Dimethyl sulphoxide and 2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline 6-sulphonate (ABTS) were purchased from Merck Millipore (Darmstadt, Germany). Dulbecco's phosphate buffer saline 10× and reagents for gel electrophoresis were from Life Technologies (Madrid, Spain). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) unless otherwise specified.

Pinto beans (*P. vulgaris* L. var. pinto) were purchased from Semillas Iglesias S. A. (Salamanca, Spain). Seeds were cleaned and stored in polyethylene containers at 4 °C. Commercial food-grade enzymes Alcalase® 2.4L FG (2.4 AU/g) and Savinase® (16 KNU/g) were kindly provided by Novozymes (Bagsvaerd, Denmark). The myofibroblast-like cell line CCD-18Co, derived from a human colonic mucosal biopsy, was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA).

2.2. Determination of protease and esterase activities in commercial enzymatic preparations

Protease activities of Alcalase and Savinase were determined by a spectrophotometric method using casein as the substrate. Rate of hydrolysis of casein was measured in 50 mM potassium phosphate buffer at 50 °C and pH 8 for 10 min. L-tyrosine released from casein was quantified using the Folin-Ciocalteu reagent and external calibration (0.05–0.55 μM). Absorbance at 660 nm was measured in a microplate reader Synergy HT (BioTek, Winooski, VT, USA). Data were expressed as protease U/mg protein, where units (U) are defined as μmol of tyrosine released from casein per minute. Esterase activity was determined by a spectrophotometric method using *p*-nitrophenyl butyrate as the substrate as previously described (Esteban-Torres, Reveron, Mancheño, de la Rivas, & Muñoz, 2013). The rate of hydrolysis of *p*-nitrophenyl butyrate (1 mM) was measured at 50 °C in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 8. *p*-Nitrophenol was used as standard at a concentration range of 0.12–1 mM to monitor ester hydrolysis colorimetrically. Reactions were followed by measuring the decrease in absorbance at 410 nm in a microplate reader (Synergy

HT, BioTek). Enzymatic assays were performed in triplicate. Data were expressed as U/mg protein, where esterase units (U) are defined as μmol of *p*-nitrophenol released from *p*-nitrophenyl butyrate per minute.

2.3. Preparations of pinto bean protein concentrates and hydrolysates

Seeds were ground using a coffee mill (Moulinex, Allenton, France) and passed through a 60-mesh sieve with 0.5 mm pore size. Protein extraction was performed in water at pH 8 using flour to solvent ratio of 1:10 (w/v). Flour suspension (25 g flour in 250 mL of water at pH 8) was stirred at 20 °C in an orbital shaker during 1 h (Infors, Switzerland). Flour suspension was centrifuged at $10,000 \times g$ for 15 min, and then, vacuum-filtered using a filter funnel (100–160 μm nominal pore size). Finally, filtrates were freeze-dried and stored at –20 °C under vacuum in plastic bags.

Freeze-dried pinto bean protein extracts (0.5 g) were suspended in deionized water (25 mL), equilibrated at 50 °C and the pH was adjusted to 8 with 1 M NaOH. Proteolysis was conducted by adding 2% (w/v) Alcalase or Savinase in the final reaction volume (5 mL). Reactions were performed at 50 °C, pH 8 for 120 min. Aliquots (500 μL) were withdrawn every 30 min and they were heated at 80 °C for 15 min for enzyme inactivation. Hydrolysates were centrifuged at $14,000 \times g$, at 10 °C for 10 min and freeze-dried until further analysis. Two independent replicates were obtained for each enzymatic treatment.

2.4. Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Protein profile of pinto bean protein concentrate and hydrolysates were analysed by SDS-PAGE in NuPAGE® Novex 4–12% Bis-Tris Gels. Electrophoresis was run in an XCell-sure lock Mini-Cell at 200 V under non-reducing conditions. The running and sample buffers used were 1X NuPAGE® MES-SDS (800 mL), and NuPAGE® LDS (1:4 sample to buffer ratio), respectively. Gels were stained with SimplyBlue SafeStain (100 mL) for 1 h and destained (100 mL) in deionized water for 2 h. The solution Mark 12™ (5 μL) was used as molecular weight standard.

2.5. Determination of protein and peptide content

Soluble protein concentration of samples was determined in triplicate by the DC (Detergent compatible) Protein Assay using bovine serum albumin as standard at a concentration range from 0.1 to 1 mg/mL. Peptide concentration was measured by the DC Protein Assay in permeates obtained by ultrafiltration of samples through cellulose membranes with 3 kDa molecular weight cut off (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Results were expressed as mg/g in dry weight (DW).

2.6. Determination of total polyphenol and flavonoid contents

Total phenolic (TP) content was determined in triplicate according to Przygodzka, Zielińska, Ciesarová, Kukurová, and Zieliński (2014). The absorbance was measured at 725 nm in a spectrophotometer (UV-160 1PC, Shimadzu, Kyoto, Japan). TP

content was calculated by external calibration using ferulic acid as standard at a concentration range of 0.03–1 mg/mL. Results were expressed as mg ferulic acid equivalents (FAE)/g DW. Total flavonoid (TF) content was determined in triplicate according to the method described by Zhishen, Mengcheng, and Jianming (1999). The absorbance was measured at 510 nm in a spectrophotometer (UV-160 1PC, Shimadzu). TF content was calculated by external calibration using (+)-catechin as standard at a concentration range of 0.01–0.2 mg/mL. Results were expressed as mg catechin equivalents (CAE)/g DW.

2.7. Biological activity assays

2.7.1. Antioxidant activity

2.7.1.1. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC). ORAC was determined in triplicate as previously reported (García-Mora, Peñas, Frias, & Martínez-Villaluenga, 2014). Fluorescence was measured in a microplate reader (Synergy HT, BioTek) at 520 and 485 nm for emission and excitation wavelengths, respectively. Trolox solutions at a concentration range from 8 to 160 μM were prepared for external calibration. Results were expressed as mmol Trolox equivalents (TE)/g DW.

2.7.1.2. Ferric reducing antioxidant power (FRAP). FRAP was evaluated according to Liyana-Pathirana and Shahidi (2007). The absorbance was measured at 700 nm using a spectrophotometer (UV-160 1PC, Shimadzu). Data were obtained by interpolating the absorbance on a calibration curve obtained with ascorbic acid (30–1000 μM). Results were expressed as μmol of ascorbic acid equivalents (AAE)/g DW.

2.7.1.3. Scavenging of 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) radical cation (ABTS•+) assay. This assay was performed as described by Re et al. (1999). Measurements of absorbance at 734 nm were carried out using the UV-160 temperature-controlled spectrophotometer with a CPS-Controller (Shimadzu). The standard curve was plotted based on the length of the lag phase versus Trolox concentrations within the range of 0.1–0.75 mM. The antioxidant capacity was expressed as μmol TE/g DW.

2.7.1.4. Determination of reducing activity by cyclic voltammetry (CV). A potentiostat/galvanostat (GAMRY, Warminster, PA, USA) was used for voltammetric experiments as it was previously reported (Zielińska, Nagels, & Piskula, 2008). Cyclic voltammetric experiments were performed in ethanol/water (1:1, v/v) and samples (40 mg/mL) mixed with 0.2 M sodium acetate–acetic buffer (80% methanol, pH 5) at a ratio of 1:1 (v/v). The cyclic voltammograms were acquired in the range of –100 to +1200 mV at a scanning rate of 100 mV s^{–1} and at 2 mV intervals. Trolox solutions within the concentration range of 0.1–1.5 mM were used and the results were expressed as μmol TE/g DW.

2.7.2. Determination of ACE inhibitory activity

The ACE inhibitory activity was determined in permeates <3 kDa of bean protein hydrolysates and control samples. Permeates were obtained after ultrafiltration of samples through membranes of 3 kDa pore size (Millipore Corporation). Assays were performed in triplicate at a concentration of 1.5 mg/mL as

previously described (Garcia-Mora et al., 2014). The IC₅₀ values (concentration in mg dry weight/mL that inhibits 50% of the ACE activity) of the most active hydrolysates were calculated by dose–response curves plotted in GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

2.7.3. Inflammatory activity

2.7.3.1. Cell culture maintenance and cell treatment. CCD-18Co colon myofibroblasts were seeded at 6000 cells/cm² and were grown in Eagle's minimum essential medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 100 U mL⁻¹ penicillin, 100 µg mL⁻¹ streptomycin and 10% (v/v) foetal bovine serum at a final pH 7.2–7.4. Cell cultures were maintained at 37 °C under a 5% CO₂/95% air atmosphere at constant humidity. Colon myofibroblasts were subcultured when reached >80% of confluence using Trypsin-EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid; 0.25–0.03%, v/v). Cell cultures between 33 and 34 population doubling levels were used for all experiments.

For cell treatment, cells were cultured in 96-well plates (BD Bioscience, Warsaw, Poland) at a concentration of 6000 cells/cm². Cells were grown up to confluence, and were treated with bean hydrolysates at a concentration of 0.01 mg DW/mL. Bean hydrolysates were dissolved in phosphate buffer saline, sonicated and vortexed three times, centrifuged at 10,000 × g for 20 minutes, and filtered (0.22 µm) prior to addition to the culture media. Confluent cells were co-treated with the pro-inflammatory cytokine IL-1β (1 ng/mL) for 24 h. Subsequently, culture medium of the treated cells was collected and stored at –80 °C until further analysis.

2.7.3.2. Cell viability assay. Cell viability was estimated using the 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay (Cilla, Laparra, Alegria, Barbera, & Farre, 2008). This assay determines *in vitro* cytotoxic effects of treatments described above. Briefly, at the end of the incubation time, optical density was measured at a test wavelength of 570 nm and a reference wavelength of 690 nm using a microplate reader (Synergy H1, BioTek).

2.7.3.3. Determination of interleukin 6 (IL-6). Culture medium was used for the analysis of IL-6 using an ELISA kit from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA). Absorbance was measured in a microplate reader Infinite M1000 Pro (Tecan, Männedorf, Switzerland) at 450 nm. Results were expressed as ng IL-6/mL. The minimum detection level was 23 pg/mL.

2.8. Identification and quantification of phenolic compounds by reversed phase high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry

About 0.1 g of samples was extracted by sonication in 1 mL methanol/water (20/80, v/v) for 30 min at temperature below 40 °C. A second sample extraction was performed in 100% methanol as described above. Afterwards, extraction samples were centrifuged at 16,100 × g and 4 °C (Centrifuge 5415R, Eppendorf Iberica, Madrid, Spain) for 5 min and stored in a capped vial at 4 °C until further analysis. Aliquots of extracts (2 µL) were injected into a LC system (LC-200 Eksigent, AB SCIEX,

Framingham, MA, USA) consisted of a dual-channel pump, column oven, autosampler (set at 4 °C) and system controller coupled with mass spectrometer (QTRAP 5500, AB SCIEX, Concord, Ontario, Canada) consisting of a triple quadrupole, ion trap and ion source of electro-spray ionization (ESI) and controlled by the Analyst 1.5.1. Chromatographic separation was performed at 45 °C at a flow rate of 15 µL/min on HALO C₁₈, 2.7 µm, 0.5 × 50 mm column (AB SCIEX). Compounds were eluted in a gradient system composed of water/formic acid (99.05/0.95, v/v, phase A) and acetonitrile/formic acid (99.05/0.95, v/v, phase B). Gradient was 5% B for 0.1 min; 5–90% B in 1.9 min and 90% B for 0.5 min. A reversed gradient consisting of 90–5% B in 0.2 min and 5% B for 0.3 min was carried out to reach the initial conditions between runs. Qualitative and quantitative analysis were made using Multiple Reaction Monitoring (MRM) method for appropriate external standards (Supplementary Table S1). The calibration curves (the range of 1–100 nM) were linear with a correlation coefficient of 0.97. Optimal ESI-MS/MS conditions of analysis are presented in Supplementary Table S2.

2.9. Identification of bioactive peptides by tandem nanoUPLC-ESI-MS

For peptide identification, 10 µg of the most active hydrolysates were desalted using a reverse phase (PorosR2[®]) column with 80% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid. Later, the peptides were dried and resuspended with 10 µL 0.1% TFA. An aliquot of 5 µL of resuspended sample was injected in the linear trap quadrupole Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Peptides were loaded onto a C18-A1 ASY-Column 2 cm precolumn (Thermo Scientific, Madrid, Spain) and then eluted onto a Biosphere C18 column (inner diameter 75 µm, 15 cm long, 3 µm particle size) (NanoSeparations) at a flow rate of 250 nL/min on a nanoEasy high-performance liquid chromatography (Proxeon) coupled to a nanoelectrospray ion source (Proxeon).

The mobile phases used consisted of 0.1% formic acid/2% acetonitrile (solvent A) and 0.1% formic acid in 100% acetonitrile (solvent B). The solvent gradient was from 0% B to 35% B in 140 min. Mass spectra were acquired in the positive ion mode. Full-scan MS spectra (m/z 400–1800) were acquired with a target value of 1,000,000 at a resolution of 30,000 at m/z 400 and the 15 most intense ions were selected for collision induced dissociation fragmentation in the linear trap quadrupole with a target value of 10,000 and normalized collision energy of 38%. Precursor ion charge state screening and monoisotopic precursor selection were enabled. Singly charged ions and unassigned charge states were rejected. Dynamic exclusion was enabled with a repeat count of 1 and exclusion duration of 30 s.

Proteome Discoverer 1.4.288 (Thermo Scientific) with MASCOT 2.3 was used to search the NCBI database, taxonomy Viridiplantae (1530236 sequences) and a home-made database with the *P. vulgaris* entries in UniProt. Database search parameters used were the following: peptide tolerance, 10 ppm; fragment ion tolerance, 0.8 Da; none enzyme and variable modification, methionine oxidation. In all peptide identifications, the probability scores were greater than the score fixed by Mascot as significant with a *p*-value < 0.05. The automatic decoy database search function of Protein Discover was enabled to allow estimation of false discovery rate (FDR).

Sequence identification with reported biological activity was compared with bioactive peptides sequences submitted to the BIOPEP database (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>).

2.10. Statistical analysis

Results are shown as the mean \pm SD of two independent experiments. Each independent experiment was performed in triplicate. Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) by Statgraphics Centurion XVI software, version 16.1.17 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD). Differences between samples were compared by using a Duncan's multiple-range test at $p \leq 0.05$ probability levels.

3. Results

3.1. Proteolytic pattern of hydrolysis

Fig. 1 shows the electrophoretic protein profile under denaturing and non-reducing conditions of the pinto bean protein concentrate (control) and their respective hydrolysates obtained at different times (30–120 min). Protein concentrate (lane C(-)) showed intense bands with molecular weights between 97 and 10 kDa. Bands corresponding to phaseolin (25, 45 and 50 kDa) and phytohaemagglutinins, α -amylase inhibitor and α -amylase β subunit (32 and 18, 15 kDa, respectively) were readily digested to smaller fractions (<15 kDa) within 30 min of Alcalase treatment. Complete degradation of these proteins was observed after 120 min of Alcalase digestion. The intensity of hydrolysis products was decreasing gradually with

time suggesting a further degradation of peptides into much smaller fractions. Savinase treatment also resulted in a considerable degradation of the main protein bands yielding smaller protein fragments (<20 kDa) within 30 min. Further hydrolysis times showed little changes in the protein profile. Some phaseolin subunits and phytohaemagglutinin protein bands remained stable after 120 min and only a slight decrease in the intensity of bands <20 kDa was observed, indicating the generation of much smaller peptides. Nevertheless, as can be observed from the figure, the proteolytic efficiency of Savinase was lower than that of Alcalase.

3.2. Concentration of peptides <3 kDa, total phenolics and flavonoids in pinto bean hydrolysates

It is well-known that bioactive peptides have short amino acid sequences (Udenigwe & Aluko, 2012). To evaluate the cost-effectiveness of pinto bean proteolysis by subtilisins to release small peptides, peptide concentration was measured in 3 kDa permeates from hydrolysates obtained at different times of hydrolysis (Table 1). Concentration of peptides <3 kDa increased time-dependently by both enzymatic treatments ($P < 0.05$) in consistency with results observed by SDS-PAGE. The highest peptide concentrations were reached after 120 min of hydrolysis and, Alcalase yielded higher values (544 mg/g) than Savinase (508 mg/g) ($P < 0.05$).

The effect of pinto bean proteolysis by subtilisins at different times of hydrolysis on total phenolic and flavonoid content is presented in Table 1. Alcalase and Savinase proteolysis markedly increased total phenolic content of hydrolysates in a time-dependent manner ($P < 0.05$). The highest total phenolic content was observed in hydrolysates obtained by Alcalase after 120 min

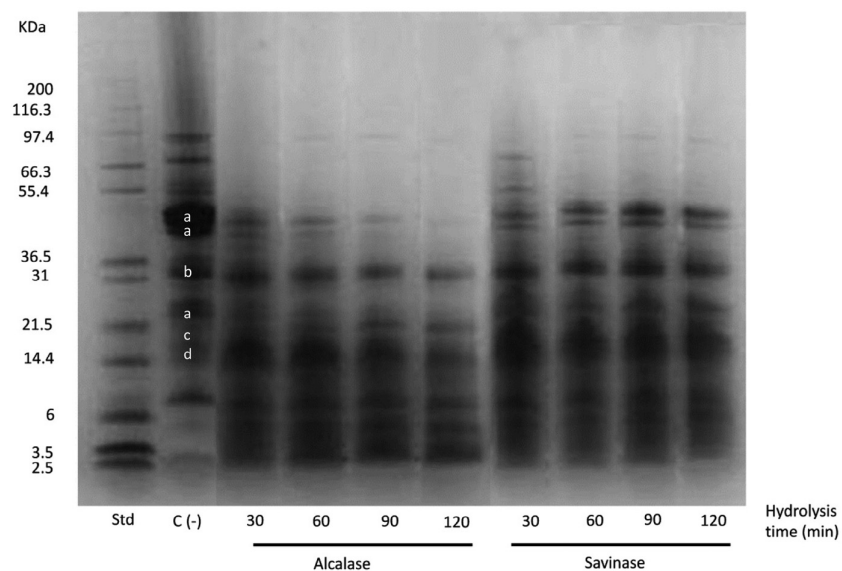


Fig. 1 – Electrophoretic profile of pinto bean proteins hydrolysed by subtilisins at different hydrolysis times. Std, indicate the molecular weights of proteins in the standard Mark12™ (Life Technologies, CA, USA); 0, 30, 60, 90, 120 min are different hydrolysis times. C(-) corresponds to pinto bean protein concentrate. Letters indicate the molecular weight of the main pinto bean proteins. Letters a, b, c and d have been assigned for phaseolin subunits, phytohaemagglutinins, α -amylase inhibitor and α -amylase β subunit, respectively.

Table 1 – Peptides (<3 kDa), total phenolic (TP) and total flavonoid (TF) contents in pinto bean hydrolysates obtained by different subtilisins at different hydrolysis times.

Time (min)	ALCALASE			SAVINASE		
	Peptides <3 kDa (mg/g)	TP (mg FAE/g)	TF (mg CAE/g)	Peptides <3 kDa (mg/g)	TP (mg FAE/g)	TF (mg CAE/g)
0	92.67 ± 4.98 ^a _A	6.14 ± 0.52 ^a _A	3.47 ± 0.30 ^a _A	99.15 ± 4.97 ^a _A	5.22 ± 0.05 ^a _A	3.43 ± 0.24 ^a _A
30	225.30 ± 5.65 ^b _A	11.72 ± 0.23 ^c _B	3.21 ± 0.17 ^a _A	303.52 ± 21.75 ^b _A	10.79 ± 0.26 ^b _A	4.06 ± 0.14 ^b _B
60	344.85 ± 16.77 ^c _A	10.27 ± 0.82 ^b _A	3.71 ± 0.37 ^a _A	352.52 ± 5.65 ^c _A	11.34 ± 0.25 ^b _A	4.42 ± 0.39 ^c _A
90	457.93 ± 23.57 ^d _B	11.59 ± 0.87 ^b _C	3.59 ± 0.07 ^a _A	362.26 ± 5.65 ^c _A	12.93 ± 0.44 ^d _A	4.02 ± 0.20 ^b _C
120	543.78 ± 7.03 ^e _B	12.74 ± 0.73 ^c _A	3.57 ± 0.17 ^a _A	507.96 ± 6.77 ^d _A	12.25 ± 0.28 ^c _A	3.65 ± 0.19 ^{ab} _A

Data indicate mean value ± standard deviation. Different lowercase letters indicate significant differences among hydrolysis times for each enzyme treatment ($P < 0.05$, Duncan test). Different uppercase letters indicate significant differences between enzymatic treatments at the same hydrolysis time ($P < 0.05$, Duncan test).

(12.7 mg FAE/g) and Savinase after 90 min (12.9 mg FAE/g), with no significant differences among them ($P > 0.05$). Surprisingly, Alcalase treatment did not affect total flavonoid concentration ($P > 0.05$) whereas Savinase digestion for 30 min significantly increased total flavonoid concentration (4.1 mg CAE/g) ($P < 0.05$). Longer hydrolysis times yielded a similar flavonoid content with the exception of Savinase treatments for 120 min resulting in values non significantly different from control ($P > 0.05$).

3.3. Antioxidant activity of pinto bean protein hydrolysates

Table 2 shows the effect of two subtilisin treatments and hydrolysis times on antioxidant activity of whole fraction of pinto bean hydrolysates. The antioxidant activity was determined by four methods, ORAC, FRAP, ABTS, and CV, based on different antioxidant mechanisms. ORAC assay is based on hydrogen atom transfer (HAT) mechanism, FRAP and CV assays use electron transfer (ET) mechanisms and the ABTS method comprises mixed HAT and ET mechanisms (Craft, Kerrihard, Amarowicz, & Pegg, 2012).

Alcalase and Savinase treatments considerably increased the antioxidant activity, as determined by ORAC and ABTS assays, compared to control ($P < 0.05$). The highest ORAC values were obtained after 120 min for both enzymes (348.99 mmol

TE/g for Alcalase and 326.11 mmol TE/g for Savinase), with no significant differences among them ($P > 0.05$). ABTS radical scavenging activity increased progressively and reached a maximum after 120 min (120 μ mol TE/g) as a consequence of Alcalase proteolysis whilst it reached a plateau after 30 min in the Savinase treatment (123 μ mol TE/g) ($P > 0.05$). Regarding FRAP, enzymatic treatments generally brought about a significant reduction in the electron donor ability of hydrolysates, with the exception of Alcalase proteolysis for 60 min that resulted in a slight increase ($P < 0.05$). Finally, both enzymes improved the electro reducing power of hydrolysates, as measured by CV, although this effect was dependent on hydrolysis time. Shorter hydrolysis times (30 min) gave rise to the highest electro reducing power in hydrolysates obtained by Alcalase (26.0 μ mol TE/g) whereas longer digestion times (90 and 120 min) were needed to increase this activity in Savinase hydrolysates (24.1–25.3 μ mol TE/g). Significant positive correlations were found between antioxidant activity (measured as ORAC, ABTS and CV) and total phenolic/peptide content of Alcalase and Savinase hydrolysates ($P < 0.05$). In contrast, FRAP was negatively correlated with peptide and total phenolic contents ($P < 0.05$).

3.4. ACE inhibitory activity of pinto bean hydrolysates

ACE inhibitory activities were determined in 3 kDa permeates of samples hydrolysed by Alcalase and Savinase at different

Table 2 – Antioxidant activity of pinto bean hydrolysates obtained by different subtilisins at different hydrolysis times.

Hydrolysis time (min)	ORAC (mmol TE/g)	FRAP (μ mol AAEE/g)	ABTS (μ mol TE/g)	CV (μ mol TE/g)
ALCALASE				
0	263.04 ± 18.29 ^a _A	68.90 ± 0.45 ^b _A	0.36 ± 0.02 ^a _A	20.66 ± 0.11 ^a _A
30	308.25 ± 25.53 ^b _B	66.42 ± 0.34 ^a _A	0.43 ± 0.01 ^c _A	25.97 ± 1.58 ^b _B
60	324.88 ± 29.16 ^b _C	72.90 ± 1.13 ^c _A	0.40 ± 0.02 ^b _A	20.49 ± 0.69 ^a _A
90	291.63 ± 21.22 ^b _A	69.54 ± 1.13 ^b _A	0.43 ± 0.02 ^c _A	23.11 ± 0.16 ^b _A
120	348.99 ± 9.12 ^c _A	64.18 ± 0.23 ^a _A	0.48 ± 0.01 ^d _A	22.52 ± 2.15 ^b _A
SAVINASE				
0	233.47 ± 10.96 ^a _A	75.46 ± 0.68 ^b _A	0.40 ± 0.01 ^a _A	18.15 ± 0.88 ^a _A
30	262.67 ± 26.34 ^b _A	71.06 ± 0.34 ^{ab} _B	0.50 ± 0.02 ^b _B	18.14 ± 1.55 ^a _A
60	299.38 ± 21.57 ^c _A	70.82 ± 1.36 ^{ab} _A	0.50 ± 0.01 ^b _B	20.56 ± 0.84 ^a _A
90	318.25 ± 19.46 ^c _B	69.62 ± 0.34 ^{ab} _A	0.49 ± 0.02 ^b _B	24.08 ± 0.40 ^b _A
120	326.11 ± 30.18 ^c _A	67.46 ± 3.17 ^a _A	0.49 ± 0.01 ^b _A	25.94 ± 0.16 ^b _A

Data indicate mean value ± standard deviation. Different lowercase letters indicate significant differences among hydrolysis times for each enzyme treatment ($P < 0.05$, Duncan test). Different uppercase letters indicate significant differences between enzymatic treatments at the same hydrolysis time ($P < 0.05$, Duncan test).

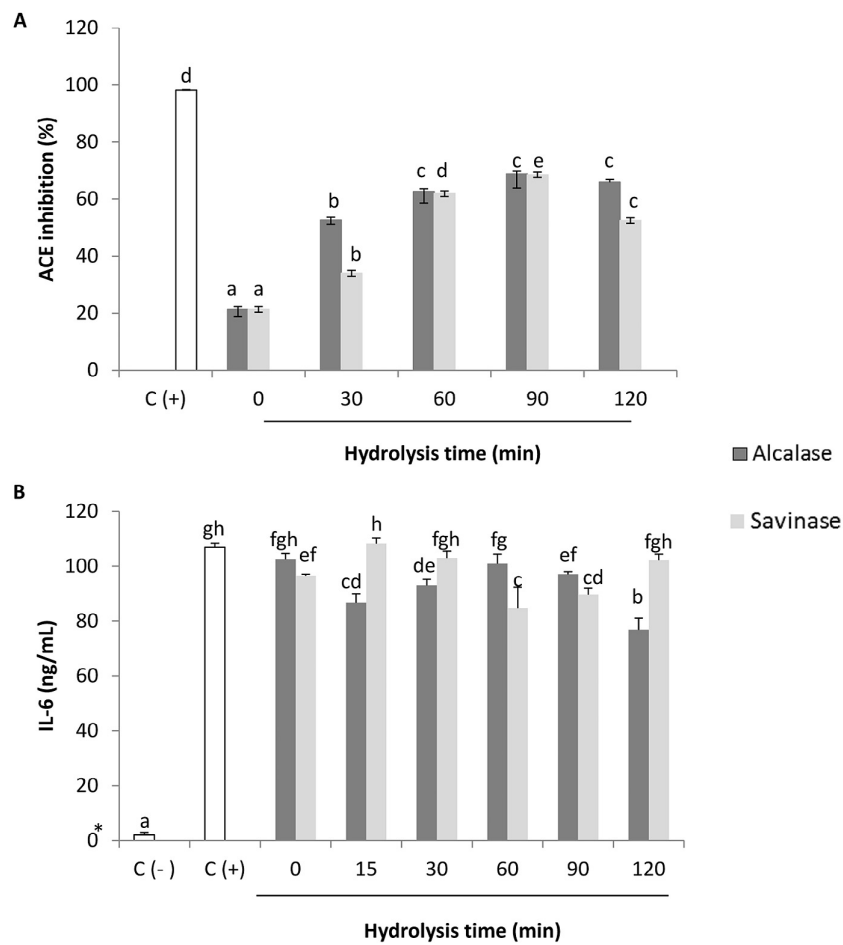


Fig. 2 – (A) ACE inhibitory activity of 3 kDa permeates from pinto bean hydrolysates (1.5 mg/mL) obtained by subtilisins (Alcalase and Savinase) at different hydrolysis times (0–120 min). C (+) indicates ACE inhibition displayed by 0.1 μ M captopril. (B) IL-6 secretion of IL-1 β -stimulated CCD-18Co cells treated by pinto bean hydrolysates for 24 h at 37 °C. C(-) refers to cells non-stimulated by IL-1 β . C(+) refers to IL-1 β -stimulated cells non-treated by hydrolysates. Results are shown as the mean \pm SD of two independent experiments. Each independent experiment was performed in triplicate. Different letters indicate significant differences among treatments ($P \leq 0.05$, Duncan test).

times (Fig. 2A). Captopril at 0.1 μ M was used as positive control (C+) displaying a 98% ACE inhibition. As compared to positive control, 3 kDa permeates of non-hydrolysed samples (0 min) displayed weak ACE inhibition (21%) at a concentration of 1.5 mg DW/mL. Enzymatic treatments brought about a significant improvement in the ACE inhibitory activity of the 3 kDa fraction ($P < 0.05$). Alcalase hydrolysis gradually increased ACE inhibitory activity up to 62% inhibition within 60 min and no improvements were observed upon further digestion ($P > 0.05$). Savinase treatment increased ACE inhibitory activity of hydrolysates time-dependently up to 90 min whereas longer hydrolysis times led to a decrease of ACE inhibition ($P < 0.05$). Most active hydrolysates produced by Alcalase for 120 min and Savinase for 90 min exhibited IC_{50} values of 0.26 and 0.23 mg/mL, respectively, with no significant differences among them ($P < 0.05$). Significant positive correlations ($P < 0.05$) were found between ACE inhibitory activity vs. peptides or total phenolic content of Alcalase ($r = 0.81$ and $r = 0.85$) and Savinase ($r = 0.86$

and $r = 0.78$) hydrolysates. These findings suggest that either peptides <3 kDa or phenolic compounds are contributing to ACE inhibitory activity of bean hydrolysates.

3.5. Anti-inflammatory activity of pinto bean hydrolysates

Fig. 2B presents the effect of Alcalase and Savinase treatment at different times on ability to ameliorate IL-1 β -induced IL-6 release of hydrolysates. Cell treatments with pinto bean hydrolysates at a concentration of 0.01 mg/mL did not affect CCD-18Co cell viability (data not shown). Unstimulated cells with IL-1 β (C-) secreted negligible amounts of IL-6 as compared to IL-1 β stimulated cells (C+) that produced 105.51 ng of IL-6/mL. Cell treatments with hydrolysates (0.01 μ g/mL) obtained by Alcalase at 15, 30 and 120 min and Savinase at 60 and 90 min resulted in a statistically significant reduction in the secretion of IL-6 by IL-1 β stimulated CCD-18Co cells ($P < 0.05$).

The hydrolysate obtained by Alcalase at 120 min was the one that most potently inhibited the IL-6 secretion by IL-1 β stimulated CCD-18Co cells (28% inhibition vs. control) followed by hydrolysates produced by Alcalase for 15 min and Savinase for 60 or 90 min (16% inhibition vs. control).

3.6. Phenolic and peptide profile of the most active pinto bean hydrolysates produced by Alcalase and Savinase

Bean hydrolysates obtained by Alcalase treatment for 120 min and Savinase for 90 min were selected for peptides and phenolics identification on the basis of its higher multifunctional properties including antioxidant, ACE inhibitory and anti-inflammatory activities.

3.6.1. Peptide profile

Table 3 shows the list of the most abundant peptides identified in selected pinto bean hydrolysates. These peptides were fragments from α -type phaseolin precursor (accession n. 21036), phaseolin (accession n. 403594) and β -type phaseolin storage protein (accession n. 169323). Peptides derived from the latter protein were only found in Savinase hydrolysates. This fact, joined to the presence of unique amino acid sequences in both hydrolysates, indicates that Alcalase and Savinase have different enzyme specificities. Using BIOPEP tools and literature data (Oseguera-Toledo, De Mejia, Dia, & Amaya-Llano, 2011), we found that partial structure of most of these peptides possessed one or a combination of bioactivities including antioxidant (underlined sequences), ACE inhibitory (bolded amino acid sequence), and anti-inflammatory (highlighted sequences) activities.

3.6.2. Phenolic profile

Table 4 shows the individual phenolic content of pinto bean protein concentrate (control) and selected hydrolysates. Hydroxycinnamic compounds were detected as free acids in pinto bean protein concentrates and accounted for 20% of the total phenolic content, ferulic acid being the major compound. Sinapic and *p*-coumaric acids were also identified as minor compounds in this non-flavonoid group. Flavan-3-ols were the most abundant phenolics in pinto bean protein concentrates accounting for approximately 44.4% of the total phenolic content. Catechin was the major flavanol (41.24 $\mu\text{g/g}$) followed by epicatechin (15.23 $\mu\text{g/g}$). Flavonols were the less abundant family of phenolics (12% of total phenolic content) in protein concentrates. In this group quercetin glycosides were the predominant compounds although quercetin aglycone and isorhamnetin, myricetin and kaempferol glycosides were also detected. Anthocyanins represented 20% of the total phenolic content in protein concentrates being found mainly as pelargonidin glycosides. Cyanidin aglycone and glycosides as well as malvidin glycosides were also identified as minor compounds of this phenolic family.

Phenolic profile of pinto bean hydrolysates obtained by Alcalase for 120 min showed slight differences compared to protein concentrate (control). A little decrease was observed in the concentration of epicatechin and quercetin 3-malonylglucoside whereas cyanidin and malvidin 3-glucoside contents were higher than control ($P < 0.05$). Interestingly, significant changes were detected in the phenolic profile of

hydrolysates produced by Savinase for 90 min. Savinase proteolysis led to a small reduction of epicatechin, quercetin 3-malonylglucoside and pelargonidin 3-malonylglucoside concentrations ($P < 0.05$). However, it is worth to note that this enzymatic treatment gave rise to 1.8- and 3-fold increase of catechin and pelargonidin concentrations, respectively. Moreover, less significant increases of minor compounds such as ferulic acid, quercetin 3-xylosylglucoside and malvidin 3-glucoside were found. To explain the higher efficiency of Savinase in increasing phenolic content in hydrolysates, esterase activity was measured in both enzymatic preparations. Results showed that esterase activity of Savinase was 3 times higher (1.00 ± 0.04 U/mg protein) than Alcalase (0.33 ± 0.05 U/mg protein) in the assayed conditions ($P < 0.05$), in consistency with differences observed in the phenolic concentrations of hydrolysates.

4. Discussion

Health organizations recommend pulse consumption as part of a healthy diet due to vast evidence of their protective and therapeutic effects on chronic diseases (Rebello et al., 2014). As a consequence, initiatives have been developed to improve their production, intake and use. In this context, the use of legumes as functional ingredients for the development of healthy foods is being explored (López-Barrios et al., 2014). Different legume proteins are being studied for their potential to generate bioactive peptides, although a careful choice of a suitable enzyme and the control of hydrolysis time, are crucial for obtaining desirable bioactive amino acid sequences and functional properties. The raw materials for the production of functional legume hydrolysates are protein concentrates (<80% protein) or protein isolates (>90% protein) (López-Barrios et al., 2014). During preparation of legume protein concentrates/isolates, soluble phenolic compounds may be extracted (Martínez-Villaluenga et al., 2009) and can interact non-covalently with storage proteins. On the other hand, during water alkaline extraction of proteins, soluble fibre components can be also isolated (Boye et al., 2010) and, as consequence, bound phenolics might be present in the resulting product. Despite the extensive research on functional legume hydrolysates, none of the studies have focused on the effect of enzymatic hydrolysis on the release of bound phenolics and how this fact affects soluble phenolic concentration and bioactivity of hydrolysates. This study shows for the first time the effectiveness of food-grade commercial proteases from *Bacillus* spp. to produce hydrolysates with bioactive peptides and phenolic compounds that result in a desirable combination of antioxidant, ACE inhibitory and anti-inflammatory activities.

The main storage protein of common bean (*P. vulgaris* L.) is phaseolin, a heterogeneous 7S globulin composed of 2 to 6 subunits that constitute up to 50% of total seed protein (Montoya, Lallès, Beebe, & Leterme, 2010). Phaseolin is highly resistant to proteolysis due to its compact and rigid structure rich in β -sheet domains, a high degree of glycosylation and high hydrophobicity. Our results indicate that phaseolin was susceptible to Alcalase and Savinase action probably due to their

Table 3 – Most abundant peptides found in the most active pinto bean hydrolysates.

ALCALASE, 120 min			SAVINASE, 90 min		
Protein	Peptide sequence ^a	MH + [Da]	Protein	Peptide sequence	MH+ [Da]
α -type phaseolin precursor, Phaseolin	SIEMKEGALFVPH	1457.75	α -type phaseolin precursor, Phaseolin	SIEMKEGALFVPH	1457.75
α -type phaseolin precursor, Phaseolin	VNPDPKEDLRRIQL	1649.92	α -type phaseolin precursor	VVNEGEAHVELVGPKGNKETFESY	2874.42
α -type phaseolin precursor, Phaseolin	DNVISSIGRAL	1144.63	α -type phaseolin precursor, Phaseolin, β -type phaseolin storage protein	YLVNPDPKEDLRRIQL	1926.07
α -type phaseolin precursor	VVNEGEAHVELVGPKGNKETFESY	2874.41	β -type phaseolin storage protein	STEAQQSYLQEFKSHILEAS	2296.11
α -type phaseolin precursor, Phaseolin	STEAQQSYLQEFKSHIL	2009.00	α -type phaseolin precursor, Phaseolin, β -type phaseolin storage protein	SIEMEGALFVPH	1458.69
α -type phaseolin precursor	GDNPIFSDNQKIPAGTIF	1933.97	α -type phaseolin precursor, Phaseolin, β -type phaseolin storage protein	VNPDPKEDLRRIQL	1649.92
α -type phaseolin precursor, Phaseolin	SQDNPFYFNSDNSWNTL	2048.86	α -type phaseolin precursor, Phaseolin, β -type phaseolin storage protein	FNSKFEEINRVL	1495.79
α -type phaseolin precursor, Phaseolin	DNVISSIGRALDGKDLVGL	1942.06	α -type phaseolin precursor, Phaseolin, β -type phaseolin storage protein	TSLREEEESQDNPFYFN	2104.91
α -type phaseolin precursor, Phaseolin	ISSIEMKEGALFVPH	1657.86	α -type phaseolin precursor, Phaseolin, β -type phaseolin storage protein	VVNEGEAHVELVGPKGNKETLEYESY	2890.41
α -type phaseolin precursor, Phaseolin	YLVNPDPKEDLRRIQL	1926.07	α -type phaseolin precursor, Phaseolin, β -type phaseolin storage protein	QADAELLVVR	1313.74
Phaseolin	SDNPIFSDHQKIPAGTIF	1986.99	Phaseolin	AMPVNNPQIHDFFLS	1729.84
Phaseolin	VVNEGEAHVELVGPKGNKETLEYESY	2890.41	α -type phaseolin precursor, β -type phaseolin storage protein	AMPVNNPQIHEFFLS	1743.85
α -type phaseolin precursor	AMPVNNPQIHEFFLS	1743.85	α -type phaseolin precursor, Phaseolin, β -type phaseolin storage protein	SIGRALDGKDLVGL	1413.81
α -type phaseolin precursor, Phaseolin	RAELSKDDVFVIPAAYPVAIK	2302.28	α -type phaseolin precursor	GDNPIFSDNQKIPAGTIF	1933.97
α -type phaseolin precursor, Phaseolin	SIEMKEGALFVPHYYSK	1999.00	Phaseolin, β -type phaseolin storage protein	SDNPIFSDHQKIPAGTIFYL	2263.15
Phaseolin	AMPVNNPQIHDFFLS	1729.84	α -type phaseolin precursor, Phaseolin, β -type phaseolin storage protein	SLREEEESQDNPFYFN	2003.86
α -type phaseolin precursor, Phaseolin	SQDNPFYFNSDNSWNTLTKN	2438.07	Phaseolin, β -type phaseolin storage protein	TSDNPIFSDHQKIPAGTIF	2088.04
α -type phaseolin precursor, Phaseolin	SDNSWNTLTKN	1325.61	α -type phaseolin precursor, β -type phaseolin storage protein	FEEGQEQEGQEGVIV	1934.87
Phaseolin	TSDNPIFSDHQKIPAGTIFYL	2364.19	α -type phaseolin precursor, Phaseolin, β -type phaseolin storage protein	SDNSWNTLTKNQYGHIRVL	2292.15
α -type phaseolin precursor, Phaseolin	SDNSWNTLTKNQYGHIR	2080.00	α -type phaseolin precursor, Phaseolin, β -type phaseolin storage protein	DNVISSIGRALDGKDLVGL	1942.06
α -type phaseolin precursor	GDNPIFSDNQKIPAGTIFYL	2210.12	Phaseolin, β -type phaseolin storage protein	SDNPIFSDHQKIPAGTIF	1986.99
Phaseolin	SDNPIFSDHQKIPAGTIFYL	2263.14	β -type phaseolin storage protein	ISSIEMEGALFVPH	1658.81
α -type phaseolin precursor, Phaseolin	VVNEGEAHVE	1082.51	α -type phaseolin precursor	GDNPIFSDNQKIPAGTIFYL	2210.12
α -type phaseolin precursor, Phaseolin	SDNSWNTLTKNQYGHIRVL	2292.15	α -type phaseolin precursor, Phaseolin, β -type phaseolin storage protein	SKRLQNLQEDYRLVEF	1910.01
α -type phaseolin precursor, Phaseolin	ISSIEMKEGALFVPHYYSK	2199.11	Phaseolin, β -type phaseolin storage protein	TSDNPIFSDHQKIPAGTIFYL	2364.19
α -type phaseolin precursor, Phaseolin	LSKDDVFVIPAAYPVAIK	1946.10	α -type phaseolin precursor, Phaseolin, β -type phaseolin storage protein	RAELSKDDVFVIPAAYPVAIK	2302.28
α -type phaseolin precursor, Phaseolin	VVNEGEAHVELVGPK	1576.83	α -type phaseolin precursor	LVGPKGNKETFESY	1810.92
α -type phaseolin precursor	SGSYFVDGHHHQEQKQKSHQQE	2678.17	α -type phaseolin precursor, Phaseolin	SIEMKEGALFVPHYYSK	1999.00

(continued on next page)

Table 3 – (continued)

ALCALASE, 120 min			SAVINASE, 90 min		
Protein	Peptide sequence ^a	MH + [Da]	Protein	Peptide sequence	MH+ [Da]
α -type phaseolin precursor	<u>SGSYFVDGHH</u> HQQE	1627.69	α -type phaseolin precursor, Phaseolin, β -type phaseolin storage protein	ILEASFNSKFEEINRVL	2009.07
α -type phaseolin precursor	KQ <u>SGSYFVDGHH</u> HQQEQKKGSHQQE	2934.32	α -type phaseolin precursor, Phaseolin, β -type phaseolin storage protein	LLPQQADAELLVVR	1677.99
α -type phaseolin precursor	INKQSGSYFVDGHHHQQEQKKGSHQ	2904.35	α -type phaseolin precursor, Phaseolin, β -type phaseolin storage protein	YLVNPDPKEDLRII	1684.93
Phaseolin	GQQEGVIVNIDSEQIKE	1885.95	α -type phaseolin precursor, Phaseolin, β -type phaseolin storage protein	LLPQQADAELLVVRS	1765.02
α -type phaseolin precursor, Phaseolin	LSKDDVFVIPAAYPVAIKAT	2118.19	α -type phaseolin precursor, Phaseolin, β -type phaseolin storage protein	VV <u>NEGEAH</u> VELVGPK	1576.83
α -type phaseolin precursor, Phaseolin	DNSWNTLFKNQYGHIRVL	2205.12	β -type phaseolin storage protein	SIEMEEGALFVPHYYSKAVIL	2509.31
α -type phaseolin precursor, Phaseolin	VNPDPKEDLRII	1408.78			
α -type phaseolin precursor, Phaseolin	YLVNPDPKEDLRII	1684.93			
α -type phaseolin precursor	TQGDNPIFSDNQKIPAGTIF	2163.07			

^a Underlined, bolded, and highlighted portion of the sequence refer to part of the peptide with reported antioxidant, ACE inhibitory and anti-inflammatory activity, respectively (BIOPEP database; Oseguera-Toledo et al., 2011).

broad specificity. Susceptibility of phaseolin to Alcalase and other proteases has also been reported by other authors (Oseguera-Toledo et al., 2011; Ruj, Boye, Simpson, & Prasher, 2012). Nevertheless, there is a clear variability in the proteolytic rate of phaseolin by Alcalase among different studies. This variability may be ascribed to a different enzyme to substrate ratio or the structural heterogeneity of phaseolin among common bean cultivars (Montoya et al., 2008). Phaseolin has a high source of variation in the precursor subunit profiles (α), α and β for phaseolins type S, T and I, respectively), in the carbohydrate composition and number of phosphate and carbohydrate binding sites (Montoya et al., 2010). As compared to Alcalase, Savinase exhibited a lower proteolytic efficiency which may be attributed to differences in enzyme specificity. These results are in contrast with our previous findings showing that Savinase was the most efficient enzyme to hydrolyse lentil globulins (García-Mora et al., 2014).

Alcalase and Savinase treatments resulted in a gradual increase of small peptides (<3 kDa) in a time-dependent manner although Alcalase gave rise to a higher accumulation of peptides than Savinase, in consistency with the differences observed in their proteolytic efficiency. Alcalase has been proven to be effective for releasing small peptides from many other legumes such as chickpea (Medina-Godoy et al., 2012), lima and jamapa beans (Torruco-Uco et al., 2009) and lentil (Barbana & Boye, 2011). However, Savinase has been used less in food technology although it has recently shown a good potential to produce small peptides from lentil proteins (García-Mora et al., 2014, 2015).

The present study has demonstrated that Alcalase and Savinase treatments increase the concentration of total phenolics in a time-dependent manner (Table 1). In contrast, chromatographic quantification of individual phenolic compounds showed that phenolic profile of Alcalase hydrolysates was not modified compared with control (Table 4). Differences between results presented in Tables 1 and 4 are explained by the analytical methods used. Total phenolic content is determined by the Folin-Ciocalteu method that quantifies all phenolics present in the sample resulting most of the times in higher values than the individual quantification of phenolics by chromatographic methods. In the latter methodology, unidentified peaks cannot be quantified and therefore total phenolic concentration is lower than TPC determined by Folin-Ciocalteu method. Interestingly, the comparative assessment of the concentration of identified phenolics in hydrolysates produced by Alcalase at 120 min and Savinase at 90 min (Table 4) indicated that the latter treatment leads to a remarkable increase in hydroxycinnamic acid (ferulic acid), flavan-3-ol (catechin) and anthocyanin (pelargonidin-3-glucoside) families. Our results are consistent with a recent investigation showing the release of flavonoids (apigenin-C glycosides) bound by ionic bridges and hydrogen bonding to γ -conglutin from lupin (Gzubinski et al., 2012). Higher concentration of hydroxycinnamic acids observed in Savinase hydrolysates obtained after 90 min can be also ascribed to the higher esterase activity found in the Savinase enzymatic preparation. Feruloyl esterases are involved in the de-esterification of dietary fibre, releasing hydroxycinnamates and derivatives (Acosta-Estrada et al., 2014). These enzymes have been described in different microorganisms including *Bacillus* spp. (Donaghy, Kelly, & McKay,

Table 4 – Phenolic profile ($\mu\text{g/g DW}$) of the most active pinto bean hydrolysates.

	CONTROL	ALCALASE, 120 min	SAVINASE, 90 min
<i>p</i> -Coumaric acid	1.00 \pm 0.01 ^a	1.01 \pm 0.03 ^a	1.13 \pm 0.11 ^a
Sinapic acid	0.21 \pm 0.01 ^a	0.19 \pm 0.01 ^a	0.24 \pm 0.04 ^a
Ferulic acid	28.24 \pm 0.08 ^a	26.41 \pm 0.23 ^a	35.23 \pm 5.75 ^b
Total hydroxycinnamic acids	26.06 \pm 0.41 ^a	27.62 \pm 0.19 ^a	59.88 \pm 5.07 ^b
Catechin	41.24 \pm 1.48 ^a	43.61 \pm 2.69 ^a	72.50 \pm 1.42 ^b
Epicatechin	15.23 \pm 0.11 ^c	11.86 \pm 0.21 ^a	13.49 \pm 0.19 ^b
Total flavanols	56.47 \pm 1.59 ^a	55.46 \pm 2.91 ^a	85.99 \pm 1.61 ^b
Quercetin 3-glucoside	8.28 \pm 0.42 ^a	8.08 \pm 0.28 ^a	9.98 \pm 1.16 ^a
Quercetin	1.60 \pm 0.05 ^a	1.70 \pm 0.11 ^a	1.78 \pm 0.27 ^a
Isorhamnetin 3-rutinoside	0.81 \pm 0.03 ^a	0.80 \pm 0.01 ^a	0.92 \pm 0.11 ^a
Myricetin 3-glucoside	0.75 \pm 0.05 ^a	0.70 \pm 0.01 ^a	0.76 \pm 0.01 ^a
Quercetin 3-xylosylglucoside	0.79 \pm 0.00 ^a	0.77 \pm 0.02 ^a	0.96 \pm 0.07 ^b
Quercetin 3-malonylglucoside	1.87 \pm 0.06 ^c	1.37 \pm 0.00 ^a	1.66 \pm 0.01 ^b
Kaempferol 3-malonylglucoside	1.10 \pm 0.03 ^a	0.96 \pm 0.02 ^a	1.07 \pm 0.09 ^a
Total flavonols	15.20 \pm 0.48 ^a	14.37 \pm 0.41 ^a	17.13 \pm 1.72 ^a
Cyanidin 3-glucoside	1.92 \pm 0.00 ^a	1.98 \pm 0.06 ^a	1.93 \pm 0.07 ^a
Cyanidin	0.87 \pm 0.01 ^a	0.96 \pm 0.01 ^b	0.94 \pm 0.04 ^{ab}
Cyanidin 3-rutinoside	0.75 \pm 0.00 ^{ab}	0.73 \pm 0.01 ^a	0.85 \pm 0.06 ^b
Delphinidin 3-glucoside	0.91 \pm 0.00 ^a	0.91 \pm 0.04 ^a	0.98 \pm 0.11 ^a
Pelargonidin diglucoside	1.08 \pm 0.00 ^a	1.05 \pm 0.02 ^a	1.34 \pm 0.15 ^a
Malvidin 3-glucoside	0.69 \pm 0.01 ^a	1.07 \pm 0.04 ^b	1.07 \pm 0.07 ^b
Pelargonidin 3-glucoside	16.11 \pm 0.44 ^a	14.40 \pm 0.06 ^a	49.33 \pm 4.59 ^b
Cyanidin 3-malonylglucoside	1.10 \pm 0.01 ^a	1.04 \pm 0.04 ^a	1.13 \pm 0.07 ^a
Pelargonidin 3-malonylglucoside	2.63 \pm 0.01 ^c	1.64 \pm 0.05 ^a	2.31 \pm 0.09 ^b
Total anthocyanins	26.06 \pm 0.41 ^a	23.77 \pm 0.17 ^a	59.88 \pm 5.07 ^b
Total phenolics	127.18 \pm 2.58^a	121.22 \pm 2.52^a	199.61 \pm 14.22^b

Data indicate mean value \pm standard deviation. Different letters within a row are significantly different ($P < 0.05$, Duncan test).

1998), bacteria from which Alcalase and Savinase preparations were obtained.

Pinto bean hydrolysates produced by Alcalase and Savinase displayed a combination of antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities; therefore, their potential as functional food ingredients should be encouraged. Amelioration of oxidative stress through dietary antioxidants is considered a promising strategy in the prevention of CVD (Leopold, 2015). In general, pinto bean proteolysis by Alcalase and Savinase gradually increased radical scavenging activity with hydrolysis time mainly by mechanisms of hydrogen donation. As indicated by correlation analysis, this effect on radical scavenging activity (measured by ORAC and ABTS methods) could be attributed to a higher accumulation of small peptides and phenolic compounds during hydrolysis. In agreement with our results, previous studies have reported that Alcalase hydrolysis of other legume protein sources provides smaller peptide fractions with a better radical scavenging activity than high molecular weight fractions (Garcia-Mora et al., 2014; López-Barríos et al., 2014; Samaranayaka & Li-Chan, 2011). The effectiveness of Alcalase to produce antioxidant peptides has been related to its broad specificity and its preferential breakdown of hydrophobic amino acids (Gupta, Beg, & Lorenz, 2002) that act as hydrogen donors (Samaranayaka & Li-Chan, 2011). Savinase has also been reported as an effective enzyme to increase the antioxidant activity of lentil hydrolysates (Garcia-Mora et al., 2014). Comparing ORAC values of pinto bean and lentil hydrolysates produced by Savinase, it can be inferred that both hydrolysates possess a similar antioxidant activity. In general, iron reducing activity diminished as consequence of both subtilisin treatments, an effect

that was negatively correlated with higher contents of small peptides and total phenolics. In agreement with our results, other authors observed that higher reducing power in hemp hydrolysates content is linked to a larger peptide size (Girgih, Udenigwe, & Aluko, 2011). Pinto bean hydrolysates also displayed a weak electro reducing ability as mechanism of antioxidant activity that was slightly improved with proteolytic treatments at certain hydrolysis times.

ACE is a key enzyme in the renin-angiotensin-aldosterone system involved in the regulation of blood pressure. ACE acts as a peptidase releasing either a dipeptide or a tripeptide from the C-terminus or N-terminus of substrates although N-terminal hydrolysis is much reduced (Bernstein et al., 2013). ACE inhibition results in a vasodilatation through a reduction of angiotensin II levels. Clinical studies have demonstrated that ACE inhibitors significantly reduce the morbidity and mortality of patients with myocardial infarction or heart failure (Guerrero et al., 2012). Therefore, consumption of foods containing ACE inhibitors in a daily basis could be considered a promising strategy in the prevention or management of CVD. In this study, ACE inhibitory activity was improved gradually with hydrolysis time in agreement with previous studies (Medina-Godoy et al., 2012; Rui et al., 2012), this effect being related to a higher content of peptides <3 kDa and phenolic compounds as indicated by correlation analyses. Smaller peptide fractions have been found more effectively inhibiting ACE (Wan Mohtar, Hamid, Abd-Aziz, Muhamad, & Saari, 2013) probably due to the fact that the active site blocks the access to large polypeptides (Norris & Fitzgerald, 2013). Many of the food derived ACE inhibitory peptides reported in the literature are

competitive inhibitors as they bind to the active site of ACE and, thus, block the enzyme from interacting with the substrate (Barbana & Boye, 2011; Rui, Boye, Simpson, & Prasher, 2013). The IC_{50} values of the most active pinto bean hydrolysates was within the range of reported values for ACE inhibitory hydrolysates from other legumes (0.06–0.77 mg/g) (López-Barrios et al., 2014) and food protein sources (Hernández-Ledesma, Del Mar Contreras, & Recio, 2011). Nevertheless, it is worth noting that Savinase treatment in the optimal conditions gave rise to pinto bean hydrolysates with higher potency compared to lentil hydrolysates upon gastrointestinal digestion (García-Mora et al., 2014).

Inflammation is part of the host defence mechanisms against external stimuli that cause injuries. However, uncontrolled and aberrant inflammatory response has been often considered as one of the underlying pathophysiological mechanisms of hypertension and atherosclerosis (Montecucco, Mach, & Pende, 2013). Therefore, control of excessive inflammation through diet is important to maintain health and wellness. Human colon cells (CCD-18Co) treated by IL-1 β were used as a cell model of inflammation in the present study to evaluate the ability to ameliorate IL-1 β -induced IL-6 release of pinto bean hydrolysates. IL-1 β is a pro-inflammatory cytokine produced *in vivo* by activated macrophages and induces the secretion of IL-6 by both immune and non-immune cells in response to infection and injury (Dinarello, 2009). Pinto bean hydrolysates reduced significantly IL-6 secretion by the IL-1 β stimulated human colon cells, although this effect was dependent on the enzyme type and hydrolysis time. The hydrolysate obtained by Alcalase after 120 min was the most potent reducing IL-6 secretion by the IL-1 β -stimulated myofibroblasts. In agreement with our findings, anti-inflammatory activity of hydrolysates from common bean varieties Pinto Durango and Negro 8025 produced by Alcalase and pepsin-pancreatin has also been described in other cell models of inflammation such as lipopolysaccharide activated macrophages RAW267.4 (Oseguera-Toledo et al., 2011). These authors suggested the inhibition of the activation of the transcription factor NF- κ B and the downregulation of enzyme gene expression, such as inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 involved in the synthesis of pro-inflammatory molecules, as mechanisms of anti-inflammatory activity exerted by the hydrolysates.

The multiple bioactivities displayed by pinto bean hydrolysates can be explained by the enzymatic release of bioactive peptides and phenolic compounds. This was confirmed by an exhaustive analysis of the peptide and phenolic fractions of the most active hydrolysates. Results indicated that most abundant peptides in pinto bean hydrolysates contained reported antioxidant, ACE inhibitory and anti-inflammatory amino acid sequences in parts of their primary structure. Peptides which contain an ACE-inhibitory sequence within their entire structure could act as pro-drug type inhibitors (Iwaniak, Minkiewicz, & Darewicz, 2014). These inhibitors are precursors of true inhibition type peptides once released by ACE or gastrointestinal enzymes. Moreover, structural features at the C-terminal tripeptide for the blockage of ACE active site (Norris & Fitzgerald, 2013) were fulfilled by most of the peptides identified in bioactive hydrolysates. These structural features for ACE inhibition included the presence of bulky hydrophobic residues, aromatic or branched side chains, proline (P) at 1 or more

positions, positively charged Arg (R) and Lys (K) residues at position 2, Tyr (T), Phe (F), and Trp (W) residues at position 3. Some identified peptides in pinto bean hydrolysates (for instance VNPDPKEDLRIIQL, VVNEGAVHE, VVNEGAVHVELVGPK) also showed molecular characteristics described for antioxidant activity such as Val (V) at the N-terminus of the peptides, and Pro (P), His (H), in their sequences (Samaranayaka & Li-Chan, 2011). Phenolic compounds identified in hydrolysates may be also contributors to the bioactivity of hydrolysates. Structure activity studies have shown that *p*-coumaric and ferulic acid have a stronger antioxidant activity (free radical-scavenging, transition metal-chelating, and singlet oxygen quenching capacity) than other cinnamic and hydroxybenzoic acid derivatives. Catechin and epicatechin have been found among the most potent flavonoids inhibiting ACE activity *in vitro* (Guerrero et al., 2012). On the other hand, in a recent study quercetin, kaempferol and myricetin provided a greater modulation of inflammation in endothelial cell cultures compared with hydroxycinnamic acids such as *p*-coumaric, caffeic and caftaric acids (Calabriso et al., 2015). All these phenolic compounds mentioned above were detected in selected pinto bean hydrolysates.

5. Conclusions

This study demonstrates that there is a benefit in the application of subtilisins to release bioactive peptides and phenolic compounds from pinto bean proteins with potential antioxidant, ACE inhibitory and anti-inflammatory activities. Enzyme type and hydrolysis time were important factors affecting the bioactive composition of hydrolysates. Pinto bean hydrolysates obtained by Alcalase after 120 min were characterized by a higher concentration of small peptides <3 kDa. Interestingly, this is the first study showing an outstanding esterase activity of Savinase responsible for a 2-fold increase in the total phenolic concentration of the most active hydrolysates. Therefore, hydrolysates produced by Savinase after 90 min were composed of a markedly higher concentration of ferulic acid, catechin and pelargonidin-3-glucoside than Alcalase hydrolysates. The identification of the most abundant peptides in the most active hydrolysates support the potential of both enzymatic treatments to efficiently release bioactive peptides from pinto bean proteins.

Acknowledgements

This research was cofunded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and the European Union through the projects AGL2010-16310 and AGL2013-43247-R and FEDER programme, respectively. P. García-Mora thanks MINECO for providing a PhD fellowship. E. Peñas thanks the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, CSIC and European Social Fund for “Ramón y Cajal” contract.

Appendix: Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at [doi:10.1016/j.jff.2015.07.010](https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.07.010).

REFERENCES

- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46–55.
- Arnoldi, A., Zanoni, C., Lammi, C., & Boschini, G. (2015). The role of grain legumes in the prevention of hypercholesterolemia and hypertension. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34, 144–168.
- Barbana, C., & Boye, J. I. (2011). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. *Food Chemistry*, 127(1), 94–101.
- Bernstein, K. E., Ong, F. S., Blackwell, W. L. B., Shah, K. H., Giani, J. F., Gonzalez-Villalobos, R. A., Shen, X. Z., Fuchs, S., & Touyz, R. M. (2013). A modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of angiotensin-converting enzyme. *Pharmacological Reviews*, 65(1), 1–46.
- Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., & Rajamohamed, S. H. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43(2), 537–546.
- Calabriso, N., Scoditti, E., Massaro, M., Pellegrino, M., Storelli, C., Ingrosso, I., Giovinazzo, G., & Carluccio, M. A. (2015). Multiple anti-inflammatory and anti-atherosclerotic properties of red wine polyphenolic extracts: Differential role of hydroxycinnamic acids, flavonols and stilbenes on endothelial inflammatory gene expression. *European Journal of Nutrition*, doi:10.1007/s00394-015-0865-6.
- Cilla, A., Laparra, J. M., Alegria, A., Barbera, R., & Farre, R. (2008). Antioxidant effect derived from bioaccessible fractions of fruit beverages against H₂O₂-induced oxidative stress in Caco-2 cells. *Food Chemistry*, 106(3), 1180–1187.
- Craft, B. D., Kerrihard, A. L., Amarowicz, R., & Pegg, R. B. (2012). Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 148–173.
- Czubinski, J., Dwiecki, K., Siger, A., Kachlicki, P., Neunert, G., Lampart-Szczapa, E., & Nogala-Kalucka, M. (2012). Release of flavonoids from lupin globulin proteins during digestion in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(7), 1830–1836.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(14), 1818–1892.
- Dinarello, C. A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology*, 27, 519–550.
- Donaghy, J., Kelly, P. F., & McKay, A. M. (1998). Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus* spp. and *Lactobacilli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(2), 257–260.
- Esteban-Torres, M., Reveron, I., Mancheño, J. M., de la Rivas, B., & Muñoz, R. (2013). Characterization of a feruloyl esterase from *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 5130–5136.
- Food and Agricultural Organization Statistics (FAOSTAT). (2013). <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> (Accessed 20.01.15).
- García-Mora, P., Peñas, E., Frias, J., Gomez, R., & Martínez-Villaluenga, C. (2015). High-pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins. *Food Chemistry*, 171, 224–232.
- García-Mora, P., Peñas, E., Frias, J., & Martínez-Villaluenga, C. (2014). Savinase, the most suitable enzyme for releasing peptides from lentil (*Lens culinaris* var. Castellana) protein concentrates with multifunctional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), 4166–4174.
- Girgih, A. T., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2011). In vitro antioxidant properties of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysate fractions. *JAOCs. Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(3), 381–389.
- Guerrero, L., Castillo, J., Quiñones, M., García-Vallvé, S., Arola, L., Pujadas, G., & Muguerza, B. (2012). Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: Structure-activity relationship studies. *PLoS ONE*, 7(11).
- Gupta, R., Beg, Q., & Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(1), 15–32.
- Gutiérrez-Urbe, J. A., Romo-Lopez, I., & Serna-Saldívar, S. O. (2011). Phenolic composition and mammary cancer cell inhibition of extracts of whole cowpeas (*Vigna unguiculata*) and its anatomical parts. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 290–297.
- Hayat, I., Ahmad, A., Masud, T., Ahmed, A., & Bashir, S. (2014). Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): An overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(5), 580–592.
- Hernández-Ledesma, B., Del Mar Contreras, M., & Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 23–35.
- Iwaniak, A., Minkiewicz, P., & Darewicz, M. (2014). Food-originating ACE inhibitors, including antihypertensive peptides, as preventive food components in blood pressure reduction. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 114–134.
- Kohajdová, Z., Karovičová, J., & Magala, M. (2013). Effect of lentil and bean flours on rheological and baking properties of wheat dough. *Chemical Papers*, 67(4), 398–407. doi:10.2478/s11696-012-0295-3.
- Leopold, J. A. (2015). Antioxidants and coronary artery disease: From pathophysiology to preventive therapy. *Coronary Artery Disease*, 26(2), 176–183.
- Liyana-Pathirana, C. M., & Shahidi, F. (2007). The antioxidant potential of milling fractions from breadwheat and durum. *Journal of Cereal Science*, 45(3), 238–247.
- López-Barrios, L., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bioactive peptides and hydrolysates from pulses and their potential use as functional ingredients. *Journal of Food Science*, 79(3), R273–R283.
- Luna Vital, D. A., González De Mejía, E., Dia, V. P., & Loarca-Piña, G. (2014). Peptides in common bean fractions inhibit human colorectal cancer cells. *Food Chemistry*, 157, 347–355.
- Martínez-Villaluenga, C., Zieliński, H., Frias, J., Piskula, M. K., Kozłowska, H., & Vidal-Valverde, C. (2009). Antioxidant capacity and polyphenolic content of high-protein lupin products. *Food Chemistry*, 112(1), 84–88.
- Medina-Godoy, S., Ambríz-Pérez, D. L., Fuentes-Gutiérrez, C. I., Germán-Báez, L. J., Gutiérrez-Dorado, R., Reyes-Moreno, C., & Valdez-Ortiz, A. (2012). Angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidative activities and functional characterization of protein hydrolysates of hard-to-cook chickpeas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(9), 1974–1981.
- Montecucco, F., Mach, F., & Pende, A. (2013). Inflammation is a key pathophysiological feature of metabolic syndrome. *Mediators of Inflammation*, 2013, 135984.

- Montoya, C. A., Lallès, J. P., Beebe, S., & Leterme, P. (2010). Phaseolin diversity as a possible strategy to improve the nutritional value of common beans (*Phaseolus vulgaris*). *Food Research International*, 43(2), 443–449.
- Montoya, C. A., Leterme, P., Victoria, N. F., Toro, O., Souffrant, W. B., Beebe, S., & Lallès, J. P. (2008). Susceptibility of phaseolin to in vitro proteolysis is highly variable across common bean varieties (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(6), 2183–2191.
- Norris, R., & Fitzgerald, R. (2013). Antihypertensive peptides from food proteins. In B. Hernandez-Ledesma & C. C. Hsieh (Eds.), *Bioactive food peptides in health and disease* (pp. 45–72). Rijeka, Croatia: Intech Prepress.
- Oseguera-Toledo, M. E., De Mejia, E. G., Dia, V. P., & Amaya-Llano, S. L. (2011). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-induced macrophages through suppression of NF- κ B pathways. *Food Chemistry*, 127(3), 1175–1185.
- Przygodzka, M., Zielińska, D., Ciesarová, Z., Kukurová, K., & Zieliński, H. (2014). Comparison of methods for evaluation of the antioxidant capacity and phenolic compounds in common spices. *LWT – Food Science and Technology*, 58(2), 321–326.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
- Rebello, C. J., Greenway, F. L., & Finley, J. W. (2014). Whole grains and pulses: A comparison of the nutritional and health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(29), 7029–7049.
- Rui, X., Boye, J. I., Simpson, B. K., & Prasher, S. O. (2012). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of *Phaseolus vulgaris* bean hydrolysates: Effects of different thermal and enzymatic digestion treatments. *Food Research International*, 49(2), 739–746.
- Rui, X., Boye, J. I., Simpson, B. K., & Prasher, S. O. (2013). Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides of small red bean (*Phaseolus vulgaris*) hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 5, 1116–1124.
- Samaranayaka, A. G. P., & Li-Chan, E. C. Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 229–254.
- Torrucó-Uco, J., Chel-Guerrero, L., Martínez-Ayala, A., Dávila-Ortiz, G., & Betancur-Ancona, D. (2009). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. *LWT – Food Science and Technology*, 42(10), 1597–1604.
- Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77(1), R11–R24.
- Valdez-Ortiz, A., Fuentes-Gutiérrez, C. I., Germán-Báez, L. J., Gutiérrez-Dorado, R., & Medina-Godoy, S. (2012). Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur yellow) beans (*Phaseolus vulgaris*): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization. *LWT – Food Science and Technology*, 46(1), 91–96.
- Vaz Patto, M. C., Amarowicz, R., Aryee, A. N. A., Boye, J. I., Chung, H. J., Martín-Cabrejas, M. A., & Domoney, C. (2015). Achievements and challenges in improving the nutritional quality of food legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34, 105–143.
- Wan Mohtar, W. A. A. Q. I., Hamid, A. A., Abd-Aziz, S., Muhamad, S. K. S., & Saari, N. (2013). Preparation of bioactive peptides with high angiotensin converting enzyme inhibitory activity from winged bean [*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC.] seed. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), 3658–3668.
- Wang, T., He, F., & Chen, G. (2014). Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: A concise review. *Journal of Functional Foods*, 7(1), 101–111.
- World Health Organization (2014). *Global status report on noncommunicable diseases 2014*. Geneva, Switzerland.
- World Health Organization (2015). Healthy diet. Fact sheet n° 394. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs394/en/>>.
- Yeo, J., & Shahidi, F. (2015). Critical evaluation of changes in the ratio of insoluble bound to soluble phenolics on antioxidant activity of lentils during germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(2), 379–381.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559.
- Zielińska, D., Nagels, L., & Piskula, M. K. (2008). Determination of quercetin and its glucosides in onion by electrochemical methods. *Analytica Chimica Acta*, 617(1–2), 22–31.

4.2. Producción y caracterización de hidrolizados multifuncionales a partir de leguminosas mediante hidrólisis enzimática asistida por altas presiones hidrostáticas.

Las APH constituyen una tecnología emergente diseñada originalmente como una alternativa al tratamiento térmico para mejorar la seguridad y vida útil de los alimentos, preservando al mismo tiempo sus propiedades organolépticas (Balny y Masson, 1993; San Martín y col., 2002). En las últimas dos décadas, diversos estudios han demostrado que la aplicación de APH es una herramienta útil en los procesos de hidrólisis enzimática, ya que mejora el rendimiento del proceso reduciendo el tiempo de hidrólisis y los costes de producción (Peñas y col., 2004); (Peñas y col., 2006a; Peñas y col., 2006b; Quirós y col., 2007; Chicón y col., 2008; Kim y col., 2015). El efecto positivo de las APH en la hidrólisis enzimática puede atribuirse a la desnaturalización proteica inducida por la presión que causa un aumento de la susceptibilidad proteica a la hidrólisis (Chicón y col., 2008), así como un aumento de la actividad de ciertas enzimas baroestables o a una mejora de la interacción enzima-sustrato durante la presurización (Stapelfeldt y col., 1996). Así mismo, la hidrólisis enzimática asistida por APH puede generar hidrolizados con diferente composición que los obtenidos a presión atmosférica, ya que la presurización induce la exposición de secuencias aminoacídicas del sustrato no accesibles a las proteasas en la proteína nativa (Bonomi y col., 2003; Aertsen y col., 2009). Estas evidencias científicas sugieren el enorme potencial de las APH como pretratamiento o tratamiento simultáneo a la hidrólisis enzimática para la producción de hidrolizados proteicos con propiedades bioactivas. En este sentido, algunos estudios han mostrado la liberación de péptidos bioactivos a partir de proteínas de origen animal mediante la aplicación de APH simultáneamente al proceso proteolítico (Quirós y col., 2007; Hoppe y col., 2013). Sin embargo, en leguminosas los estudios encaminados a la producción de hidrolizados proteicos funcionales son muy escasos. Hasta la realización de la presente Tesis Doctoral, sólo teníamos constancia de un estudio realizado en aislados proteicos de garbanzo donde el tratamiento con APH durante la hidrólisis con Alcalasa redujo el tiempo de reacción y fue efectivo para liberar péptidos antioxidantes (Zhang y

col., 2012) Recientemente, Girgih y col. (2015) han observado que el pretratamiento por APH de aislados proteicos de guisante antes de su hidrólisis con Alcalasa causa la liberación de péptidos antioxidantes. Sin embargo, no existe ningún estudio enfocado en la obtención de hidrolizados proteicos de leguminosas con propiedades bioactivas diferentes a la actividad antioxidante. El gran potencial de las APH para la producción de hidrolizados proteicos funcionales, así como la escasez de estudios realizados en este sentido en leguminosas, nos llevó a centrar nuestro estudio en la evaluación de la eficacia del tratamiento de APH aplicado durante la hidrólisis enzimática con diversas proteasas de grado alimentario como herramienta para mejorar la eficiencia proteolítica y causar la formación de hidrolizados multifuncionales.

A continuación se presentan los resultados de este estudio en forma de dos publicaciones:

Publicación IV. La alta presión hidrostática mejora la proteólisis enzimática y produce la liberación de péptidos con actividades inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I y antioxidante a partir de proteínas de lenteja.

Publicación V. La liberación enzimática asistida por alta presión de péptidos y compuestos fenólicos aumenta la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I y antioxidante de hidrolizados de judía pinta.

Publicación IV. La alta presión hidrostática mejora la proteólisis enzimática y produce la liberación de péptidos con actividades inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina y antioxidante a partir de proteínas de lenteja.

P. García-Mora, E. Peñas, J. Frías, R. Gómez, C. Martínez-Villaluenga. High-pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins. *Food Chemistry*, 2015, 171: 224-232.

RESUMEN

Debido al gran impacto socio-económico de la hipertensión a nivel mundial, los péptidos con actividades inhibidora de la ECA y antioxidante han despertado gran interés en los últimos años, dado su efecto beneficioso en la prevención/tratamiento de dicha patología. El propósito del presente estudio fue evaluar la influencia del tratamiento por APH en la hidrólisis enzimática con diferentes proteasas de grado alimentario y en la liberación de péptidos bioactivos a partir de proteínas de lenteja. La presurización (100-300 MPa) mejoró la eficiencia proteolítica de todas las enzimas empleadas (Protamex, Savinasa, Corolasa 7089 y Alcalasa). La proteólisis realizada bajo APH (300 MPa) causó la degradación completa de las proteínas de lenteja produciendo la liberación de péptidos < 3KDa con todas las enzimas empleadas. La proteólisis con Savinasa a 300 MPa originó los hidrolizados (S300) con mayores actividades inhibidora de la ECA y antioxidante. Estas actividades no se modificaron tras someter a estos hidrolizados a un proceso de digestión gastrointestinal simulada. Se realizó una identificación de los péptidos responsables de las propiedades multifuncionales del hidrolizado S300. Estos péptidos correspondieron a fragmentos proteicos procedentes de proteínas de almacenamiento de la lenteja y del alérgeno Len c1. Los resultados obtenidos confirman el gran potencial de las APH como tratamiento simultáneo a la proteólisis enzimática para la producción económica de péptidos bioactivos a partir de proteínas de lenteja.



High-pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins



P. Garcia-Mora, E. Peñas, J. Frias, R. Gomez, C. Martinez-Villaluenga*

Institute of Food Science, Technology and Nutrition, C/ Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 April 2014
Received in revised form 11 July 2014
Accepted 26 August 2014
Available online 4 September 2014

Keywords:

Lentil peptides
High-hydrostatic pressure
Angiotensin I converting enzyme
Antioxidant activity
Proteolysis

ABSTRACT

Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory and antioxidant peptides are receiving attention due to their beneficial effects in the prevention/treatment of hypertension. The objective was to explore the effect of high hydrostatic pressure (HP) on proteolysis by different proteases and the release of bioactive peptides from lentil proteins. Pressurisation (100–300 MPa) enhanced the hydrolytic efficiency of Protamex, Savinase and Corolase 7089 compared to Alcalase. Proteolysis at 300 MPa led to a complete degradation of lentil proteins and increased peptide (<3 kDa) concentration by all enzymes. Proteolysis at 300 MPa by Savinase gave rise to lentil hydrolysates (S300) with the highest ACE-inhibitory and antioxidant activities that were retained upon *in vitro* gastrointestinal digestion. The peptides responsible for the multifunctional properties of S300 hydrolysate were identified as different fragments from storage proteins and the allergen Len c 1. These results support the potential of HP as a technology for the cost-effective production of bioactive peptides from lentil proteins during enzymatic proteolysis.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) are a worldwide health problem that represents a significant burden not only on the medical care system but also on the long-term quality of life of human population. Elevated blood pressure is one of the major independent risk factors for cardiovascular disease (Erdmann, Cheung, & Schroeder, 2008). Angiotensin converting enzyme (ACE, EC 3.4.15.1) is one of the main regulators of blood pressure; thus, inhibition of this enzyme is considered as one of the strategies for the treatment of hypertension (Hong et al., 2008). Moreover, recent evidences have found oxidative stress as one important factor underlying hypertension (Bagatini et al., 2011). Excessive amounts of reactive oxygen species affects cellular functions (Ray, Huang, & Tsuji, 2012), reduces the bioavailability of endothelial nitric oxide (Toeroek, 2008), and enhances low density lipoprotein oxidation in the vascular system (Mattson, 2009). Therefore, oxidative stress has emerged as an additional therapeutic target for prevention or treatment of hypertension.

The existing evidence continues to confirm the importance of a healthy diet and lifestyle to prevent the incidence of CVD and their related risk factors (World Health Organization, 2009). Functional foods containing bioactive proteins and peptides have

demonstrated clinical improvements in CVD risk factors (Cam & de Mejia, 2012). Biologically active peptides released from food proteins by gastrointestinal digestion or food processing possess multiple bioactive properties (antihypertensive, antioxidant, anti-inflammatory and hypocholesterolemic) and their consumption may play a significant role in promoting cardiovascular health (Hernández-Ledesma, García-Nebot, Fernández-Tomé, Amigo, & Recio, 2014). For these reasons, there has been a strong interest in the production of functional hydrolysates containing bioactive peptides for their application in functional foods that promote cardiovascular health. So far, many of the research performed on functional hydrolysates has used animal food-derived proteins (milk, egg, fish, meat) as raw materials for the production of bioactive peptides (Erdmann et al., 2008; Martínez-Maqueda, Miralles, Recio, & Hernández-Ledesma, 2012). Alternatively to animal proteins, legumes represent an economical and environmentally sustainable protein source for food industry that has begun to be investigated for the same purposes. Lentil contains approximately 28% protein on a dry weight basis (Roy, Boye, & Simpson, 2010) and its global production ranks fourth among pulse crops (Food, 2012). The enzymatic hydrolysis of lentil proteins have resulted in the production of hydrolysates with ACE-inhibitory activity and bile salts binding activity (Barbana, Boucher, & Boye, 2011; Barbana & Boye, 2011). Moreover, our research group has recently identified specific fragments from legumin, vicilin and convicilin with amino acid sequences contributing to the antioxidant and ACE-inhibitory

* Corresponding author. Tel.: +34 912587601; fax: +34 915644853.
E-mail address: c.m.villaluenga@csic.es (C. Martinez-Villaluenga).

activity of lentil hydrolysates (Garcia-Mora, Peñas, Frias, & Martínez-Villaluenga, 2014).

High hydrostatic pressure (HP) processing has experienced a huge growth in the last 20 years to become an industrial reality (Norton & Sun, 2008). HP offers the food industry applications in food preservation and creation of novel foods, textures and tastes. Besides these major applications, HP has also been used in combination with protease treatments for the production of hypoallergenic (López-Expósito et al., 2008; Peñas, Restani, et al., 2006b) and functional hydrolysates containing bioactive peptides (Hoppe, Jung, Patnaik, & Zeece, 2013; Zhang, Jiang, Miao, Mu, & Li, 2012). Previous studies have demonstrated that enzymatic proteolysis under high pressure conditions enhances the protein susceptibility to digestion (Chicón, Belloque, Recio, & López-Fandiño, 2006; Quirós, Chicón, Recio, & López-Fandiño, 2007) which makes this technology worthy of consideration to increase hydrolytic products yields and to reduce reaction time and production costs. The extent of proteolysis achieved during HP treatment greatly depends on the protein system (type of protein, pH and ionic strength of the medium), type of protease, applied pressure level and duration time of pressure treatment (Belloque, Chicón, & López-Fandiño, 2007; Chicón et al., 2006; López-Expósito et al., 2008; Peñas, Snel, Floris, Préstamo, & Gomez, 2006c). The literature about the application of high-pressure assisted proteolysis in the production of bioactive peptides from legume proteins has been largely unexplored. There is only one recent study showing that high pressure pre-treatment of chickpea proteins reduces hydrolysis time and enhance the formation of antioxidant peptides in the hydrolysates (Zhang et al., 2012).

The aim of this work was to study whether high pressure enhances the proteolytic efficiency of several proteases and to evaluate the impact of this treatment on the release of peptides with ACE-inhibitory and antioxidant activity.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Lentil seeds (*Lens culinaris* var. Castellana) were provided by Semillas Iglesias S. A. (Salamanca, Spain) and stored in polyethylene bins at 4 °C. Commercial food-grade enzymes Alcalase® 2.4L FG (2.4 AU/g), Savinase® (16 KNPU/g) and Protamex® (1.5 AU/g), were kindly provided by Novozymes (Bagsvaerd, Denmark). Corolase 7089 was provided by AB Enzymes GmbH (Darmstadt, Germany). The tripeptide Abz-Gly-Phe(NO₂)-Pro was purchased from Cymit-Química (Barcelona, Spain). All other chemicals were purchased from Sigma (Barcelona, Spain) unless otherwise specified.

2.2. Preparation of lentil protein concentrates

Whole lentil seeds were ground using a centrifugal mill (Moulinex, Allenton, France) and passed through a 60-mesh sieve with 0.5 mm pore size. Flours were stored at –20 °C before use. The lentil protein concentrates were prepared using alkaline extraction as described in Garcia-Mora et al. (2014). Briefly, lentil flour was suspended in water (solid-to-solvent ratio 1:10, w/v) and the pH was adjusted to 8. The suspension was stirred in an orbital shaker (Infors, Switzerland) at 20 °C for 1 h and then vacuum-filtered using a filter funnel (100–160 µm nominal pore size) to remove solids. Lastly, filtrates were freeze-dried and stored under vacuum in plastic bags at –20 °C until further analysis.

2.3. High pressure (HP)-assisted proteolysis

Freeze-dried lentil protein concentrates were suspended in deionised water (2%, w/v), equilibrated at 40 °C and the pH

adjusted to 8 with 0.1 M NaOH. Enzymatic proteolysis was carried out following the method of Cupp-Enyard (2008) using an enzyme to substrate ratio of 0.1 Anson Units/mg of soluble protein at 40 °C and pH 8. Anson Units are defined as the micromoles of tyrosine released from the substrate per minute. HP treatment was performed using a Stansted Fluid Power Iso-lab 900 High Pressure Food Processor (Model FPG7100:9/2C, Stansted Fluid Power Ltd., Harlow, Essex, UK) with 3 L capacity, maximum pressure of 900 MPa, and a potential maximum temperature of 100 °C. Four packed samples were introduced into the pressure unit filled with water, then treated at pressures of 100, 200, 300, 400 or 500 MPa. Pressure was increased at a rate of 600 MPa/min and maintained at the desired pressure for a holding time of 15 min; the decompression time was less than 4 s. The temperature of the pressure unit vessel was thermostatically controlled at 40 °C throughout all the treatments. The temperature of the pressure unit level was thermostatically controlled by a computer program, being constantly monitored and recorded during the process. The lentil protein concentrate was also pressurised at pH 8 without enzyme for 15 min. All HP treatments were performed in duplicate. Control hydrolysis experiments were carried out at atmospheric pressure (0.1 MPa) at 40 °C for 15 min. Enzymatic reactions were stopped by heating at 80 °C for 15 min. Finally, hydrolysates were centrifuged at 14,000 rpm, at 10 °C for 10 min, freeze-dried and stored at –20 °C until use. HP-assisted proteolysis and hydrolysis at atmospheric pressure were performed in triplicate.

2.4. Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE analysis of the protein hydrolysates was performed on NuPAGE® Novex 4–12% Bis-Tris Gels using the XCell-sure lock Mini-Cell (Invitrogen, Madrid, Spain). Electrophoresis was carried out at 200 V, and the running and sample buffers used were NuPAGE® MES-SDS, and NuPAGE® LDS (Invitrogen), respectively. Runs were carried out under non-reducing conditions in which 2-mercaptoethanol was omitted in the denaturing buffer. Electrophoretic bands were stained with SimplyBlue SafeStain (Invitrogen), followed by destaining in deionised water. The molecular weight of poly- and oligopeptides was determined by comparison with the molecular weight marker solution Mark 12™ (Invitrogen) containing myosin (200 kDa), β-galactosidase (116.3 kDa), phosphorylase B (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.3 kDa), glutamic dehydrogenase (55.4 kDa), lactate dehydrogenase (36.5 kDa), carbonic anhydrase (31.0 kDa), trypsin inhibitor (21.5 kDa), lysozyme (14.4 kDa), aprotinin (6.0 kDa), insulin B chain (3.5 kDa) and insulin A chain (2.5 kDa).

2.5. Determination of soluble protein and the content of peptides <3 kDa

Soluble protein content was measured in pressurised and non-pressurised lentil protein concentrates and hydrolysates at pH 8 by DC protein assay (Biorad) using bovine serum albumin (BSA) as standard. For peptide concentration, hydrolysates were submitted to ultrafiltration through membranes of 3 kDa pore size (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) and permeates were analysed by the DC protein assay (Biorad) using BSA as standard.

2.6. Determination of ACE-inhibitory activity

Protein hydrolysates and their controls were passed through a Sep-Pak C18 cartridge (Waters, Milford, MA, USA) before ECA inhibitory assay to eliminate non-protein compounds. The retained compounds were eluted with 60% acetonitrile containing 0.1% TFA in water. ACE-inhibitory activity of samples was further measured

in duplicate at a protein concentration of 0.5 mg/mL. The fluorescence-based protocol of Sentandreu and Toldrá (2006) was used. The generated fluorescence was read every minute for 30 min at emission and excitation wavelengths of 355 and 405 nm, respectively, in a microplate fluorometer (Biotek, Winooski, VT, USA). IC₅₀ values expressed in protein concentration (mg/mL) were calculated for the most active hydrolysates. IC₅₀ was determined by dose–response curves in which the range of protein concentration was distributed in a logarithmic scale and using the non-linear regression sigmoidal curve fit function in GraphPad Prism 4.00 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA).

2.7. Determination of oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

Samples were passed through a Sep-Pak C18 cartridge (Waters, Milford, MA, USA) and retained compounds were eluted with 60% acetonitrile containing 0.1% TFA in water. The antioxidant capacity of samples was measured in duplicate by fluorescence using the ORAC method as described previously (Torino et al., 2013). Results were expressed as $\mu\text{mol Trolox equivalents (TE)}/\text{g hydrolysate}$.

2.8. Identification of bioactive peptides by MALDI/TOF

The proteomics analysis was carried out by matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight tandem mass spectrometry (MALDI TOF/TOF) at the Proteomics Facility UCM-FPCM, a member of ProteoRed-ISCIH network. Hydrolysates having the highest ACE-inhibitory and antioxidant activity were selected for peptide identification. Sample (1 μL) was spotted onto a MALDI target plate and allowed to air-dry at room temperature. Then, 0.4 μL of a 3 mg/mL of α -cyano-4-hydroxy-transcinnamic acid matrix (Sigma) in 50% acetonitrile were added to the dried peptide digest spots and allowed again to air-dry at room temperature. Analyses were performed in a 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA) operating in positive reflector mode, with an accelerating voltage of 20 kV. All mass spectra were calibrated internally using peptides from the auto digestion of trypsin. The analysis by MALDI TOF mass spectrometry produces peptide mass fingerprints and the peptides observed with a Signal to Noise greater than 20 can be collated and represented as a list of monoisotopic molecular weights. Proteins ambiguously identified by peptide mass fingerprints were subjected to MS/MS sequencing analyses using the 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA). The most intense multiply charged ions were selected for collision-induced dissociation. Fragment-ion spectra (MS/MS spectra) were acquired in the ion reflector mode over the m/z range 50–2500 and were sequenced by using the PepSeq de novo sequencing algorithm (Micromass).

For protein identification, NCBI nr taxonomy Viridiplantae (1530236 sequences) and a home-made *L. culinaris* database with the Uniprot entries was searched using MASCOT 2.3 (matrix-science.com) through the Global Protein Server v3.6 from Applied Biosystems. The presence of the identified peptides in lentil proteins was confirmed using the BLAST tool (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The search parameters were the following: (i) peptide mass tolerance 80 ppm; (ii) MS–MS fragments tolerance 0.3 Da; and (iii) oxidised methionine as variable modification.

2.9. In vitro gastrointestinal digestion

Lentil hydrolysates produced by selected protease type and hydrolysis time were further subjected to simulated gastrointestinal digestion by sequential hydrolysis using pepsin and pancreatin without the presence of phosphatidylcholine according to Moreno,

Mellon, Wickham, Bottrill, and Mills (2005). Digestions were stopped by heating samples in boiling water for 10 min. Samples were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and then freeze-dried. Protein content was determined for each sample using the DC Protein Assay (Biorad) and BSA as standard.

2.10. Statistical analysis

Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) by Statgraphics Centurion XVI software, version 16.1.17 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, Md). Differences between samples were compared by using a Duncan's multiple-range test at $P \leq 0.05$ probability levels.

3. Results and discussion

3.1. Effect of pressurisation on lentil protein solubility at alkaline pH

Protein solubility is a critical factor in the hydrolytic yield of proteins that may be negatively affected by pressure treatment, therefore, soluble protein concentration of HP-treated protein concentrates at different pressure levels was firstly measured. Pressurised protein concentrates at 100, 200 and 300 MPa showed similar soluble protein content as control ($8.21 \pm 0.44\text{ mg protein/mL}$), while higher pressures of 400 and 500 MPa significantly reduced the soluble protein content ($5.9 \pm 0.72\text{ mg protein/mL}$, respectively) ($P < 0.05$). Our result agrees with previous studies showing a decrease in the solubility of lupin, green pea, soybean and chickpea 7S and 11S globulins at pressure levels of 400–450 MPa or higher (Angioloni & Collar, 2013; Chapleau & De Lamballerie-Anton, 2003). In contrast, HP-treated globulins of red kidney bean showed enhanced solubility with increasing pressure levels (Yin, Tang, Wen, Yang, & Li, 2008). This difference may be attributed to differences of protein type, nature and conformational stability between legume proteins. The reduced protein solubility observed at 400 and 500 MPa for lentil proteins could be explained by the formation of insoluble protein aggregates. Pressure-induced protein aggregates have been formed in kidney bean protein isolates by a rupture of hydrophobic interactions in the protein core that lead to exposure of the buried hydrophobic groups and sulphhydryl (SH) groups to the protein surface resulting in a gradual unfolding of vicilins structure (Yin et al., 2008). Upon pressure release, the exposed hydrophobic and free sulphhydryl groups can be involved in new hydrophobic interactions and disulphide bonds, leading to vicilin aggregation of the pressure-denatured protein (Yin et al., 2008). Based on these results, pressure levels from 100 to 300 MPa were used to study the effect of pressurisation on enzymatic hydrolysis of lentil proteins.

3.2. Effect of pressurisation on enzymatic hydrolysis of lentil proteins and release of peptides

Fig. 1 (panel A) presents the SDS–PAGE profile under non-reducing conditions of controls and samples hydrolysed by Alcalase, Protamex, Savinase and Corolase 7089 at 0.1, 100, 200 and 300 MPa. Electrophoretic profile of lentil protein concentrate (control) showed intense bands with apparent molecular masses (MM) from 14.4 to 95 kDa. The major bands found in lentil concentrate had estimated MM of 50 and 65 kDa, which correspond to subunits of 7S globulins such as vicilin (48 kDa) and convicilin (63 kDa), respectively, according to UniProt database (<http://www.uniprot.org/>). Other bands with lower MM of 40, 20 and <15 kDa were considered to belong to 11S acidic subunit, 11S basic subunit and a mixture of γ -vicilin and albumin polypeptides, respectively (<http://www.uniprot.org/>). Pressurisation at 100, 200 and 300 MPa did not

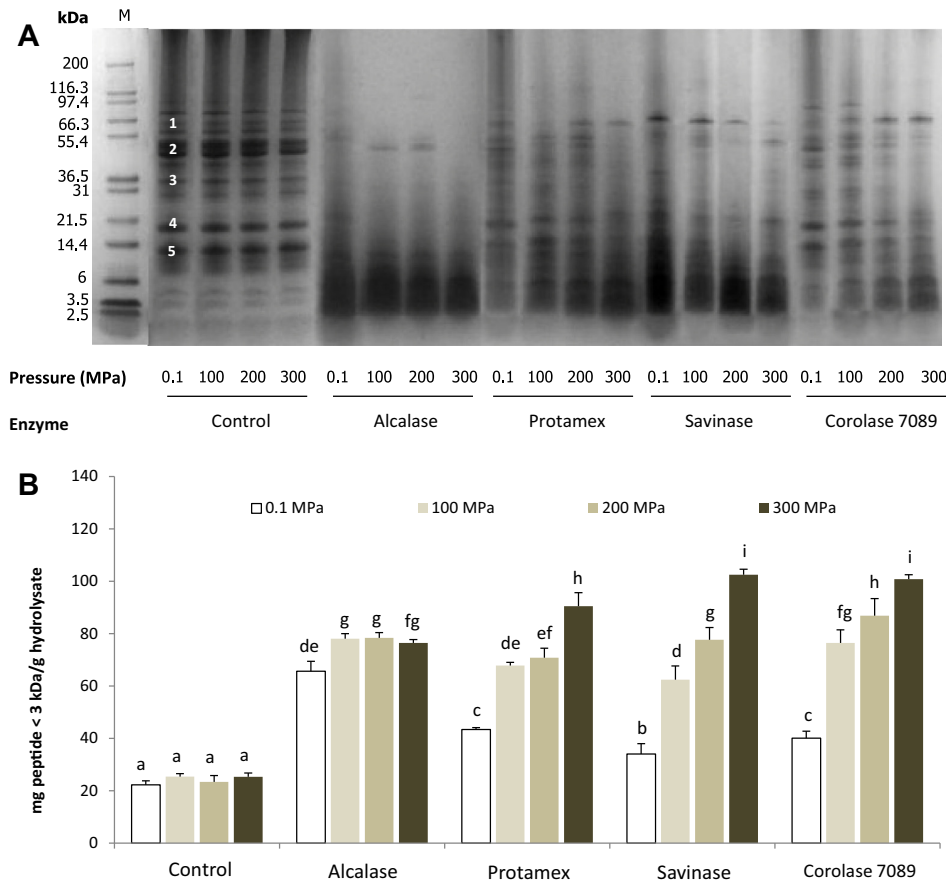


Fig. 1. SDS–PAGE profile (A) and peptide (<3 kDa) content (B) of lentil proteins hydrolysed by commercial proteases at different pressures (0.1, 100, 200, 300 MPa) for 15 min. M: molecular weight marker (Mark 12™, invitrogen); 1: Convicilin; 2: Vicilin; 3: 11S acidic subunit; 4: 11S basic subunit; 5: γ -vicilin, albumin. Means with different letters are significantly different ($P \leq 0.05$, Duncan test). Error bars represent the standard deviation of the mean.

alter the electrophoretic protein profile of lentil protein concentrates (Fig. 1 panel A). Unlike what has been reported for other proteins such as β -lactoglobulin and ovalbumin, the absence of new bands in the SDS–PAGE profile confirms that HP treatment of lentil proteins did not give rise to dissociation of globulin subunits or formation of disulphide-linked oligomers (Chicón, Belloque, Alonso, & López-Fandiño, 2008; Chicón et al., 2006; Quirós et al., 2007).

Protein bands corresponding to 7S and 11S globulins were absent or drastically reduced following Alcalase and Savinase incubation, respectively (Fig. 1, panel A) and, consequently, a greater intensity was observed for low molecular weight bands <10 kDa. In contrast, Protamex and Corolase 7089 protein digestion resulted in a slightly decreased intensity of the major protein bands giving rise to hydrolysates composed of polypeptides with a wide range of MM from 70 to 14 kDa. These observations are consistent with our previous results, showing that complete proteolysis of lentil proteins was achieved after 1 and 3 h of hydrolysis at atmospheric pressure by Alcalase and Savinase, respectively (García-Mora et al., 2014). In contrast, Protamex and Corolase 7089 treatment for 6 h was inefficient to remove all intact protein (García-Mora et al., 2014). Moreover, enzymatic hydrolysis of lentil proteins at 0.1 MPa by all enzymes increased significantly the content of peptides <3 kDa ($P \leq 0.05$) compared to control (Fig. 1B). Hydrolysates produced at atmospheric pressure by Alcalase showed the highest content of peptides <3 kDa (65.6 mg/g hydrolysate) followed by Protamex (43.4 mg/g hydrolysate), Corolase 7089 (40.1 mg/g hydrolysate) and Savinase (34.0 mg/g hydrolysate).

As compared to the proteolysis at atmospheric pressure, proteolysis under HP led to qualitative differences in the hydrolysis pattern observed by SDS–PAGE, except for Alcalase (Fig. 1 panel A). Alcalase digestion of lentil proteins under HP slightly increased the concentration of small peptides at pressures from 100 to 300 MPa (1.19-fold) compared to hydrolysis at atmospheric pressure (Fig. 1B). This observation is consistent with a previous study showing that Alcalase activity increased slightly at low pressure levels (100–300 MPa) (Zhang et al., 2012). In contrast, pressurisation above 200 MPa considerably increased lentil proteins susceptibility to enzymatic hydrolysis by Savinase, Protamex and Corolase (Fig. 1, panel A). In these cases, the extent of proteolysis increased with pressure level up to 300 MPa. 7S and 11S globulins were more extensively or completely hydrolysed under HP (200–300) after 15 min. HP-assisted proteolysis at 300 MPa enhanced drastically the intensity of protein fragments <6 kDa (Fig. 1A) and the concentration of peptides <3 kDa (Fig. 1B) compared to at lower pressure levels. These results agree with previous works on HP-assisted proteolysis of ovalbumin by trypsin, chymotrypsin and pepsin that brought about increased levels of the proteolysis products (Quirós et al., 2007). These results are in agreement with previous reports showing that pressurisation during enzyme treatment enhances hydrolysis of soy (Peñas, Préstamo, Baeza, Martínez-Molero, & Gomez, 2006a; Peñas, Restani, et al., 2006b; Peñas, Snel, et al., 2006c), chickpea (Zhang et al., 2012), kidney bean (Yin et al., 2008, egg white (Hoppe et al., 2013) and milk proteins (Peñas, Préstamo, et al., 2006a) by different enzymes.

Enhancement of protein susceptibility to proteolysis under pressure can be explained by the exposure of new cleavage sites on the substrate through several pressure-induced phenomena such as protein unfolding and enhancement in structural flexibility of the substrate that expose new cleavage sites (Belloque et al., 2007). HP can also enhance enzyme activity and/or the substrate-enzyme interaction (Stapelfeldt, Petersen, Kristiansen, Qvist, & Skibsted, 1996). Changes in the three-dimensional structure of enzyme could also affect its active site resulting in an increased activity or a change in the substrate specificity as have been suggested (Claeys, Indrawati, Van Loey, & Hendrickx, 2003). On the contrary, pressure levels above 300 MPa may cause a loss of their activity or a complete inactivation as it have been reported for trypsin or Alcalase (Chicón et al., 2006; Yin et al., 2008; Zhang et al., 2012). In the case of pressure-sensitive enzymes a different approach in the production of protein hydrolysates is the application of HP before enzymatic hydrolysis. Peñas, Préstamo, et al. (2006a), Peñas, Restani, et al. (2006b), Peñas, Snel, et al. (2006c) found a more extensive proteolysis in hydrolysates when cows milk whey was pressurised before Corolase 7089 treatment instead of simultaneously to proteolysis.

3.3. Effect of high pressure (HP) on ACE-inhibitory activity of lentil hydrolysates

Lentil protein concentrates showed a weak ACE inhibitory activity (20%) that was significantly increased upon enzymatic digestion treatment ($P \leq 0.05$) regardless of the enzyme used (Table 1). Alcalase and Savinase digestion at atmospheric pressure gave rise to higher values of ACE inhibition (57% and 46%, respectively) than Protamex and Corolase 7086 (36% and 34%, respectively). These results were also observed in our previous work, although higher ACE inhibition values were found in lentil hydrolysates submitted to longer incubation times up to 2–3 h depending on the protease type (Garcia-Mora et al., 2014).

The ACE inhibitory activity of lentil protein concentrates (0.1 MPa) remained similar after pressurisation (100–300 MPa). However, HP treatment during lentil proteolysis affected differently the ACE-inhibitory activity of hydrolysates produced by different enzymes (Table 1). Enzymatic hydrolysis with Alcalase at 100 MPa caused a reduction in the ACE inhibitory activity of hydrolysates compared to controls at atmospheric pressure

($P < 0.05$). Moreover, higher pressures (200 and 300 MPa) brought about a higher decrease in the ACE-inhibitory activity of hydrolysates produced from Alcalase. Even though pressurisation slightly enhanced proteolytic degradation by Alcalase and accumulation of small peptides <3 kDa (Fig. 1) there was not a direct relationship with the ACE inhibitory activity of hydrolysates. These results might be due to the release of amino acid sequences with lower ACE inhibitory activity. In contrast, enzymatic proteolysis by Protamex, Savinase or Corolase 7089 at high pressure (100–300 MPa) significantly improved the ACE-inhibitory activity of hydrolysates ($P \leq 0.05$) compared to their controls at 0.1 MPa. Protamex digestion at 200 MPa gave rise to lentil hydrolysates exhibiting a higher ACE inhibition (65.3%) than hydrolysates obtained at 100 and 300 MPa. ACE-inhibitory activity of hydrolysates produced by Savinase and Corolase 7089 under high pressure was noticeably improved with increasing pressure levels up to 300 MPa. Finally, combined Savinase and Corolase 7089 treatments with pressures of 300 MPa resulted in the highest values of ACE-inhibitory activity (69.5% and 70.8% ACE inhibition, respectively). Comparing these results from our previous study, longer time of hydrolysis at atmospheric pressure was needed to achieve similar ACE inhibitory values to those found in lentil hydrolysates produced from Savinase under pressure (Garcia-Mora et al., 2014). Moreover, lentil proteolysis by Corolase 7089 at 0.1 MPa during 6 h brought about hydrolysates with a significantly lower ACE inhibitory activity (28–50% inhibition) (Garcia-Mora et al., 2014) than those obtained at 300 MPa. Our results indicated that HP promoted the release of bioactive sequences likely due to the higher accessibility of enzymes to the substrate and the exposure of new target residues. The protease specificity and the optimum degree of hydrolysis also play a very important role in the release and accumulation of peptides with ACE-inhibitory activity (Quirós et al., 2007). In agreement with our results previous studies higher amounts of antihypertensive peptides were produced after 1 h of ovalbumin hydrolysis under 200–400 MPa than after 8 h of hydrolysis at atmospheric pressure (Quirós et al., 2007).

3.4. Effect of high pressure (HP)-assisted proteolysis on antioxidant activity of lentil hydrolysates

Protein digestion at atmospheric pressure for 15 min did not change the initial ORAC values (242.2 $\mu\text{g TE/g}$ protein concentrate)

Table 1
ACE-inhibitory activity of lentil protein hydrolysates produced by HP-assisted proteolysis by commercial proteases at different pressures.

Pressure (MPa)	ACE inhibition (%)				
	Control	Alcalase	Protamex	Savinase	Corolase 7089
0.1	20.34 \pm 1.23 ^A	57.24 \pm 3.92 ^D	36.6 \pm 0.06 ^B	45.99 \pm 1.38 ^C	34.58 \pm 1.92 ^B
100	22.24 \pm 1.89 ^A	55.73 \pm 2.92 ^B	51.24 \pm 5.33 ^B	54.27 \pm 0.04 ^B	52.51 \pm 1.62 ^B
200	25.85 \pm 4.81 ^A	50.68 \pm 5.29 ^B	65.29 \pm 6.19 ^C	52.52 \pm 2.50 ^B	61.08 \pm 1.36 ^C
300	20.49 \pm 3.23 ^A	40.80 \pm 2.25 ^A	57.76 \pm 0.12 ^C	69.46 \pm 0.09 ^C	70.77 \pm 0.20 ^C

Data indicate mean value \pm standard deviation of two independent experiments. Means with different lowercase letters within a column are significantly different ($P < 0.05$, Duncañs test). Means with different uppercase letters within a row are significantly different ($P < 0.05$, Duncañs test). Control: sample after no enzyme.

Table 2
Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of lentil protein hydrolysates produced by HP-assisted proteolysis by commercial proteases at different pressures.

Pressure (MPa)	ORAC ($\mu\text{moles TE/g}$)				
	Control	Alcalase	Protamex	Savinase	Corolase 7089
0.1	242.16 \pm 19.74 ^A	251.48 \pm 10.95 ^A	245.16 \pm 15.61 ^A	224.42 \pm 13.18 ^A	248.79 \pm 24.03 ^A
100	231.93 \pm 17.35 ^A	278.79 \pm 13.51 ^B	274.30 \pm 14.36 ^B	271.12 \pm 14.35 ^B	313.88 \pm 17.85 ^B
200	214.17 \pm 21.99 ^A	225.75 \pm 18.02 ^A	265.40 \pm 20.07 ^B	416.37 \pm 35.09 ^D	330.32 \pm 19.74 ^C
300	215.37 \pm 10.28 ^A	225.68 \pm 14.15 ^A	232.10 \pm 22.45 ^A	403.86 \pm 21.10 ^C	360.99 \pm 8.31 ^B

Data indicate mean value \pm standard deviation of two independent experiments. Means with different lowercase letters within a column are significantly different ($P < 0.05$, Duncañs test). Means with different uppercase letters within a row are significantly different ($P < 0.05$, Duncañs test). Control: sample with no enzyme.

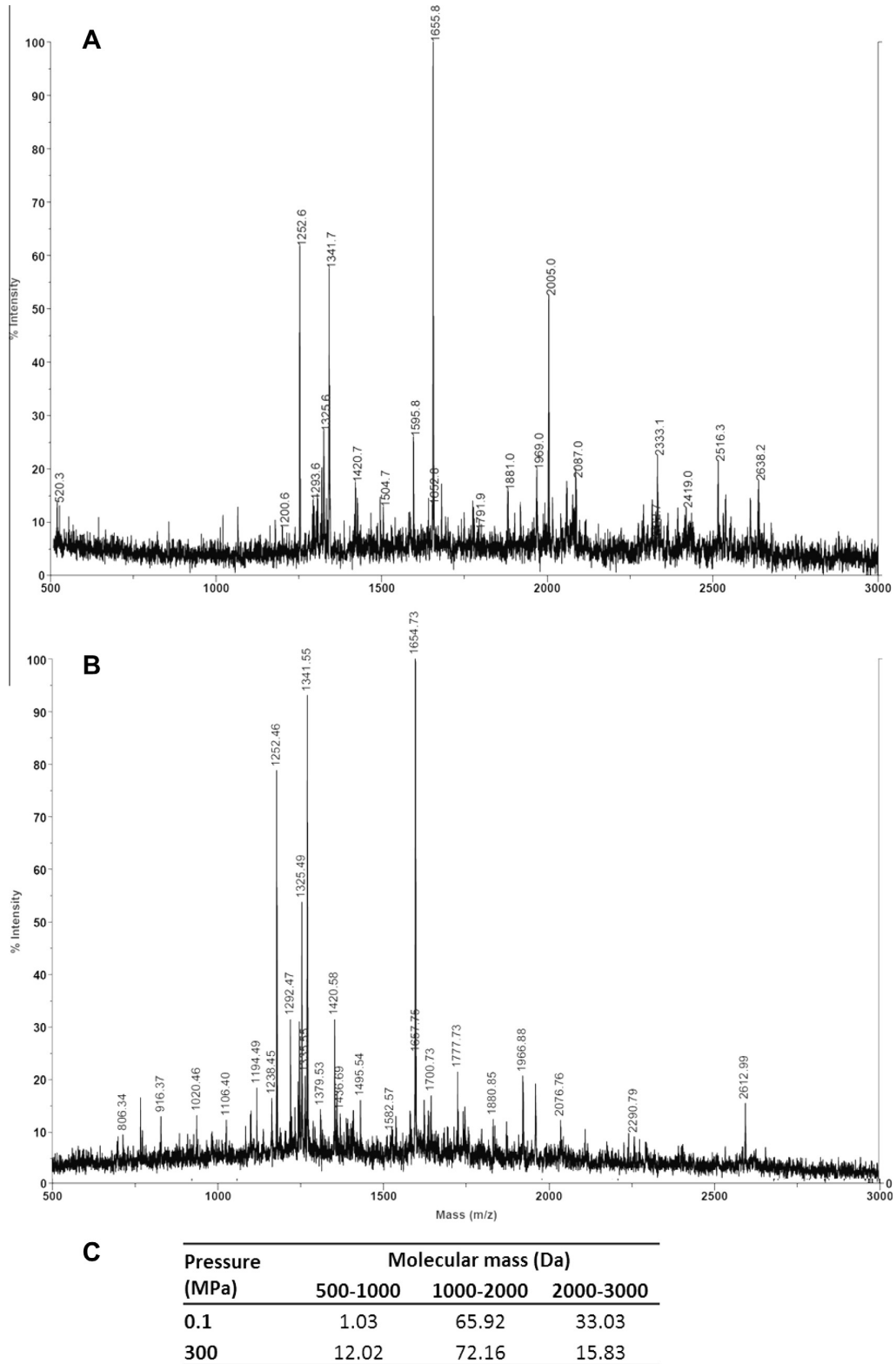


Fig. 2. Representative peptide mass fingerprints of 3 kDa permeates of hydrolysates derived from Savinase digestion at atmospheric pressure (A) and 300 MPa (B) for 15 min. Percentage distribution of peptide masses (C) found in lentil hydrolysates produced by Savinase at 0.1 and 300 MPa.

observed in non-hydrolysed lentil proteins (Table 2). The combined treatment of pressure at 100 MPa and enzymatic proteolysis resulted in hydrolysates with higher ORAC values than those obtained at 0.1 MPa ($P < 0.05$). Higher pressure levels of 200 and 300 MPa applied during enzymatic proteolysis had a different impact on the antioxidant activity of hydrolysates depending on the protease used (Table 2). ORAC values of hydrolysates produced by Alcalase at 200 and 300 MPa were significantly lower than the ones produced at 100 MPa ($P < 0.05$). A similar result was found when proteolysis was performed by Protamex at 300 MPa. In contrast, Savinase digestion at higher pressure levels (200 and 300 MPa) resulted in increased antioxidant activity compared to hydrolysates obtained at 100 MPa ($P < 0.05$). In this case, ORAC values reached a two-fold increase versus control (S0.1 hydrolysates). On the other hand, similar ORAC values were observed for hydrolysates produced by Corolase 7089 at the different pressure levels tested (100, 200 and 300 MPa). Finally, it is worth noting that proteolysis conducted by Savinase at 200 and 300 MPa resulted in the highest ORAC values (416.4 and 403.9 $\mu\text{g TE/g}$ hydrolysate). Similarly to our results, Zhang et al. (2012) reported an increased antiradical activity of chickpea hydrolysates obtained by Alcalase treatment at 100–200 MPa for 10 min that was related to increased amounts of low molecular weight peptides. However, Alcalase treatment of chickpea protein isolate at 300 MPa did not improve the antiradical activity of hydrolysates due to protein aggregation and enzyme deactivation. In controversy with previous works, in our study there was not a direct relationship between antioxidant activity of hydrolysates and the amount of low molecular weight peptides (Carrasco-Castilla et al., 2012). Similarly to the ACE inhibitory activity, the specificity of the protease used to release antioxidant peptides and the optimum degree of proteolysis that accumulates bioactive peptides is what determines the antioxidant activity of hydrolysates.

3.5. Effect of pressurisation on peptides recovered in the 3 kDa permeates of selected lentil hydrolysates

Hydrolysate produced by Savinase at 300 MPa was selected for further characterisation of the peptide fraction due to its higher concentration of peptides <3 kDa, ACE-inhibitory and antioxidant activities. Small peptide fractions are mostly the major contributors to the ACE-inhibitory and antioxidant activity of protein hydrolysates. For this reason, peptide characterisation was performed in the peptide fraction <3 kDa obtained by ultrafiltration

through a 3 kDa membrane. Fig. 2 presents representative MALDI TOF peptide mass fingerprints of 3 kDa permeate from hydrolysates produced by Savinase at 0.1 (Panel A) and 300 MPa (Panel B). Major differences between MALDI spectra were found for ions with molecular masses from 2000 to 3000 Da. Ions at m/z of 2333.1, 25516.3, 2636.2 were not present in hydrolysates produced at 300 MPa. HP affected to the distribution of peptide molecular masses in the hydrolysate that was characterised by increased percentage of peptides <2000 Da and a lower percentage of peptides >2000 Da (Fig. 2 panel C). The five intense signals at m/z 1252.46, 1325.49, 1341.55, 1420.58 and 1654.73 observed in the hydrolysates obtained by Savinase digestion at 300 MPa (Fig. 2; panel B) were identified as DLPVLRWLKL, SRSDQDNPFIF, REQIEELRRL, DLAI PVNRPGLQ, DLAI PVNRPGLQSF, respectively (Table 3). These peptides have not been previously identified and corresponded to different fragments of the main storage lentil proteins (Legumin, Vicilin and Convicilin) and allergens (Len c 1.0101 and 1.0102) (Table 3). Other less intense signals were mostly identified as fragments of allergens Len c 1.0101 and 1.0102. We previously identified the peptide DLPVLRWLKL along with other peptide sequences by LC-MS/MS in lentil hydrolysates produced by Savinase proteolysis at atmospheric pressure for 2 h (Garcia-Mora et al., 2014). The difference in the peptide pattern between the hydrolysates produced by Savinase at atmospheric pressure for 2 h and 300 MPa for 15 min could be attributed to the different degree of hydrolysis achieved in the hydrolysates. The predicted biological activities found in the amino acid sequence of these peptides were ACE-inhibitory (bolded sequences) and antioxidant activities (underlined sequences). Moreover, these peptides had residues such as alanine (A), valine (V), leucine (L), and phenylalanine (F) at the C-terminus, all of them considered as target residues for the ACE catalytic site (Cheung, Wang, Ondetti, Sabo, & Cushman, 1980). Regarding structure–activity relationship of antioxidant peptides, several reports have related the antiradical activity with the prevalence of hydrophobic amino acids such as Ala (A), Pro (P), Val (V), Ile (I), Leu (L), Phe (F), Trp (W), and Tyr (Y) which may act as proton donors. These amino acids were present in the identified peptides of the present study (Contreras, Hernandez-Ledesma, Amigo, Martin-Alvarez, & Recio, 2011; Elias et al., 2006). Specifically, Tyr (Y) and Trp (W) have been reported as the main responsible for the antioxidant activity of peptides in the ORAC method (Elias, Kellerby, & Decker, 2008). His (H) was also found within the amino acid sequence of some of the identified peptides. This amino acid has been commonly associated with antioxidant

Table 3

Peptides identified by MALDITOF/TOF in the 3 kDa permeate of lentil hydrolysates produced by HP-assisted proteolysis using Savinase at 300 MPa for 15 min.

Observed mass	Calculated mass	Fragment	Peptide sequence	Intensity (%)
1106.40	1105.22	Legumin A1 f(424–432) Legumin A2 f(431–439)	SDRFTYVAF	12.16
1194.49	1194.31	Allergen Len c 1.0101/1.0102 f(21–30)	ENENGHIRLL	18.24
1238.45	1238.32	Vicilin type C f(29–38) Allergen Len c 1.0101 f(2–11)	RSDQDNPFIF	16.29
1252.46	1252.57	Legumin A f(370–379) Legumin A2 f(373–382)	DLPVLRWLKL	78.65
1325.49	1325.40	Vicilin type C f(28–38) Allergen Len c 1.0101/1.0102 f(1–11)	SRSDQDNPFIF	53.62
1341.55	1341.53	Convicilin f(352–361)	REQIEELRRL	92.95
1420.58	1420.63	Allergen Len c 1.0101 f(121–133)	DLAI PVNRPGLQ	31.29
1426.63	1426.64	Allergen Len c 1.0101/1.0102 f(123–135)	AIPVNRPGQLQSF	15.49
1654.73	1654.89	Allergen Len c 1.0101/1.0102 f(122–135)	DLAI PVNRPGLQSF	100
1700.73	1699.88	Allergen Len c 1.0101/1.0102 f(17–30)	QTIVENENGHIRLL	16.77
1777.73	1778.76	Allergen Len c 1.0101/1.0102 f(311–325)	DEEEGQEEETTKQVQ	21.32
1880.85	1881.21	Allergen Len c 1.0101/1.0102 f(122–137)	DLAI PVNRPGLQSFLL	12.28
2612.99	2613.81	Allergen Len c 1.0101/1.0102 f(159–179)	FNTEYEEIEKVLLEEQEQKSG	15.36

Bolded and underlined sequence regions correspond to reported ACE-inhibitory and antioxidant activity, respectively, in BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>).

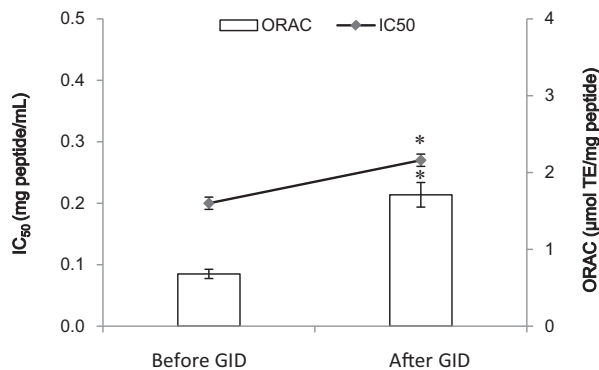


Fig. 3. Effect of gastrointestinal digestion (GID) on the ACE-inhibitory and antioxidant activity of 3 kDa permeates of hydrolysates produced by Savinase at 300 MPa. Lines represent ACE-inhibitory activity and columns show antioxidant activity before and after *in vitro* gastrointestinal digestion. *Statistically different ($P < 0.05$) from non-digested control.

activity due to its hydrogen-donating and radical-trapping imidazole ring (Elias et al., 2008), therefore, peptides containing His are likely to contribute to the antioxidant activity observed in lentil hydrolysates. The identification of all these peptide sequences supported the multifunctional properties of lentil hydrolysates produced by Savinase treatment at 300 MPa as mentioned above.

3.6. Effect of gastrointestinal digestion on ACE-inhibitory and antioxidant activities of selected lentil hydrolysates

Gastrointestinal enzymes may cause structural degradation of food-derived peptides consequently affecting their biological activity. Therefore, to study how gastrointestinal digestion could affect the biological activity of peptides present in the hydrolysate obtained by Savinase at 300 MPa, 3 kDa permeates were sequentially digested with pepsin and pancreatin under simulated gastrointestinal conditions. Fig. 3 shows ACE-inhibitory (expressed as IC₅₀) and antioxidant activities (expressed as μmol TE/mg peptide) of 3 kDa permeate of the selected hydrolysate before and after *in vitro* gastrointestinal digestion. *In vitro* gastrointestinal digestion caused a slight loss of ACE-inhibitory activity as evidenced by higher IC₅₀ values (0.27 mg peptide/mL) compared to non-digested control (0.20 mg peptide/mL) ($P \leq 0.05$). On the contrary, simulated gastrointestinal digestion resulted in a 2-fold increase in the antioxidant activity of the 3 kDa permeate which reached an ORAC value of 1.71 μmol TE/mg peptide. This observation could be explained by the release of new fragments by gastrointestinal enzymes with higher antioxidant capacity.

4. Conclusions

In comparison to atmospheric pressure, 300 MPa enhanced the proteolytic efficiency of four food-grade proteases (Alcalase, Protamex, Savinase and Corolase 7089) giving rise to a higher degradation of the major lentil storage proteins and a greater accumulation of peptides <3 kDa. Increased ACE-inhibitory activity was observed in hydrolysates when HP assisted the proteolysis of the different enzymes, with exception of Alcalase. Moreover, there is also a potential benefit to be gained by application of this technology to increase the antioxidant capacity of lentil hydrolysates through a selection of the appropriate protease and pressure level. In this study, proteolysis at 300 MPa by Savinase gave rise to lentil hydrolysates with the highest ACE inhibitory and antioxidant activities in a relatively short time (15 min). In addition, the biological activity of these hydrolysates was highly retained (ACE inhibitory activity)

or improved (antioxidant activity) upon *in vitro* gastrointestinal digestion. The identification of several peptides in these hydrolysates containing bioactive amino acid sequences in their structure support the potential of HP treatment as a technology to efficiently release bioactive peptides from lentil proteins.

Acknowledgements

We thank the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO – Spain) for funding under the program Plan Nacional de Proyectos de Investigación Aplicada (Project number AGL2010-16310) and for granting P. Garcia-Mora a predoctoral fellowship.

References

- Angiolini, A., & Collar, C. (2013). Impact of high hydrostatic pressure on protein aggregation and rheological properties of legume batters. *Food and Bioprocess Technology*, 6(12), 3576–3584.
- Bagatini, M. D., Martins, C. C., Battisti, V., Gasparetto, D., da Rosa, C. S., Spanevello, R. M., et al. (2011). Oxidative stress versus antioxidant defenses in patients with acute myocardial infarction. *Heart and Vessels*, 26(1), 55–63.
- Barbana, C., Boucher, A. C., & Boye, J. I. (2011). In vitro binding of bile salts by lentil flours, lentil protein concentrates and lentil protein hydrolysates. *Food Research International*, 44(1), 174–180.
- Barbana, C., & Boye, J. I. (2011). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. *Food Chemistry*, 127(1), 94–101.
- Belloque, J., Chicón, R., & López-Fandiño, R. (2007). Unfolding and refolding of β-lactoglobulin subjected to high hydrostatic pressure at different pH values and temperatures and its influence on proteolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5282–5288.
- Cam, A., & de Mejia, E. G. (2012). Role of dietary proteins and peptides in cardiovascular disease. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56(1), 53–66.
- Carrasco-Castilla, J., Javier Hernandez-Alvarez, A., Jimenez-Martinez, C., Jacinto-Hernandez, C., Alaiz, M., et al. (2012). Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 135(3), 1789–1795.
- Chapleau, N., & De Lamballerie-Anton, M. (2003). Improvement of emulsifying properties of lupin proteins by high pressure induced aggregation. *Food Hydrocolloids*, 17(3), 273–280.
- Cheung, H. S., Wang, F. L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F., & Cushman, D. W. (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 255(2), 401–407.
- Chicón, R., Belloque, J., Alonso, E., & López-Fandiño, R. (2008). Immunoreactivity and digestibility of high-pressure-treated whey proteins. *International Dairy Journal*, 18(4), 367–376.
- Chicón, R., Belloque, J., Recio, I., & López-Fandiño, R. (2006). Influence of high hydrostatic pressure on the proteolysis of β-lactoglobulin A by trypsin. *Journal of Dairy Research*, 73(1), 121–128.
- Claeys, W. L., Indrawati, A., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2003). Review: Are intrinsic TTIs for thermally processed milk applicable for high-pressure processing assessment? *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4(1), 1–14.
- Contreras, M. M., Hernandez-Ledesma, B., Amigo, L., Martin-Alvarez, P. J., & Recio, I. (2011). Production of antioxidant hydrolysates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT – Food Science and Technology*, 44(1), 9–15.
- Cupp-Enyard, C. (2008). Sigma's non-specific protease activity assay-casein as a substrate. *Journal of Visualized Experiments*, 19, e899.
- Elias, R. J., Bridgewater, J. D., Vachet, R. W., Waraho, T., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2006). Antioxidant mechanisms of enzymatic hydrolysates of β-lactoglobulin in food lipid dispersions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25), 9565–9572.
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 430–441.
- Erdmann, K., Cheung, B. W. Y., & Schroeder, 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.
- Food and Agricultural Organization from the United Nations (FAOSTAT) 2012. Available from: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (last accessed 13.12.13).
- García-Mora, P., Peñas, E., Frias, J., & Martínez-Villaluenga, C. (2014). Savinase the most suitable enzyme for releasing peptides from lentil (*Lens culinaris* var. Castellana) protein concentrates with multifunctional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 4166–4174.
- Hernández-Ledesma, B., García-Nebot, M. J., Fernández-Tomé, S., Amigo, L., & Recio, I. (2014). Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. *International Dairy Journal*, 38(2), 82–100.

- Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W., & Chi, L. (2008). The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs? *Peptides*, 29(6), 1062–1071.
- Hoppe, A., Jung, S., Patnaik, A., & Zeece, M. G. (2013). Effect of high pressure treatment on egg white protein digestibility and peptide products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17, 54–62.
- López-Expósito, I., Chicón, R., Belloque, J., Recio, I., Alonso, E., & López-Fandiño, R. (2008). Changes in the ovalbumin proteolysis profile by high pressure and its effect on IgG and IgE binding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), 11809–11816.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I., & Hernández-Ledesma, B. (2012). Antihypertensive peptides from food proteins: A review. *Food and Function*, 3(4), 350–361.
- Mattson, M. P. (2009). Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Experimental Gerontology*, 44(10), 625–633.
- Moreno, F. J., Mellon, F. A., Wickham, M. S. J., Bottrill, A. R., & Mills, E. N. C. (2005). Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. *The FEBS Journal*, 272(2), 341–352.
- Norton, T., & Sun, D. W. (2008). Recent advances in the use of high pressure as an effective processing technique in the food industry. *Food and Bioprocess Technology*, 1(1), 2–34.
- Peñas, E., Préstamo, G., Baeza, M. L., Martínez-Molero, M. I., & Gomez, R. (2006a). Effects of combined high pressure and enzymatic treatments on the hydrolysis and immunoreactivity of dairy whey proteins. *International Dairy Journal*, 16(8), 831–839.
- Peñas, E., Restani, P., Ballabio, C., Préstamo, G., Fiocchi, A., & Gómez, R. (2006b). Assessment of the residual immunoreactivity of soybean whey hydrolysates obtained by combined enzymatic proteolysis and high pressure. *European Food Research and Technology*, 222(3–4), 286–290.
- Peñas, E., Snel, H., Floris, R., Préstamo, G., & Gomez, R. (2006c). High pressure can reduce the antigenicity of bovine whey protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, 16(9), 969–975.
- Quirós, A., Chicón, R., Recio, I., & López-Fandiño, R. (2007). The use of high hydrostatic pressure to promote the proteolysis and release of bioactive peptides from ovalbumin. *Food Chemistry*, 104(4), 1734–1739.
- Ray, P. D., Huang, B.-W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981–990.
- 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.
- Sentandreu, M. Á., & Toldrá, F. (2006). A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity. *Nature Protocols*, 1(5), 2423–2427.
- Stapelheldt, H., Petersen, P. H., Kristiansen, K. R., Qvist, K. B., & Skibsted, L. H. (1996). Effect of high hydrostatic pressure on the enzymic hydrolysis of β -lactoglobulin B by trypsin, thermolysin and pepsin. *Journal of Dairy Research*, 63(1), 111–118.
- Toeroek, J. (2008). Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension. *Physiological Research*, 57(6), 813–825.
- Torino, M. I., Limon, R. I., Martínez-Villaluenga, C., Mäkinen, S., Pihlanto, A., Vidal-Valverde, C., et al. (2013). Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chemistry*, 136(2), 1030–1037.
- World Health Organization (2009). Cardiovascular diseases (CVDs) (accessed 03.09.13).
- Yin, S. W., Tang, C. H., Wen, Q. B., Yang, X. Q., & Li, L. (2008). Functional properties and in vitro trypsin digestibility of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate: Effect of high-pressure treatment. *Food Chemistry*, 110(4), 938–945.
- Zhang, T., Jiang, B., Miao, M., Mu, W., & Li, Y. (2012). Combined effects of high-pressure and enzymatic treatments on the hydrolysis of chickpea protein isolates and antioxidant activity of the hydrolysates. *Food Chemistry*, 135(3), 904–912.

Publicación V. La liberación enzimática asistida por alta presión de péptidos y compuestos fenólicos aumenta las actividades inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I y antioxidante de hidrolizados de judía pinta.

P. García-Mora, E. Peñas, J. Frias, H. Zieliński, W. Wiczkowski, D. Zielinska, C. Martínez-Villaluenga. High pressure-assisted enzymatic release of peptides and phenolics increase angiotensin converting enzyme I inhibitory and antioxidant activities of pinto bean hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (enviado).

RESUMEN

En este estudio se realizó la hidrólisis de un concentrado proteico obtenido a partir de judía pinta con Alcalasa y Savinasa (0,1 U/mg proteína de judía) a presión atmosférica y bajo APH (100 y 200 MPa) a 50 °C durante 15 min. La proteólisis asistida por APH incrementó el rendimiento hidrolítico de ambas subtilisinas originando, consecuentemente, un incremento significativo del contenido de péptidos de bajo peso molecular (< 3 kDa), de flavonoides y de compuestos fenólicos totales. Estos efectos positivos producidos por las APH causaron una mejora de las actividades inhibidora de la ECA y antioxidante de los hidrolizados de judía pinta, aunque los niveles de presión óptimos dependieron del tipo de enzima empleada en la hidrólisis. La hidrólisis con Alcalasa a 100 MPa causó un aumento de la actividad inhibidora de la ECA, del poder reductor (determinado por voltimetría cíclica) y de la actividad de atrapar radicales libres de los hidrolizados. Sin embargo, en los hidrolizados producidos con Savinasa, las mayores actividades para atrapar radicales libres e inhibir la ECA se observaron a 200 MPa. La hidrólisis con Savinasa a 200 MPa fue considerado el tratamiento más efectivo para conseguir un aumento del contenido de péptidos de bajo peso molecular, flavonoides, compuestos fenólicos totales y actividad de atrapar radicales de oxígeno en los hidrolizados. En este hidrolizado se identificaron secuencias de aminoácidos cortas procedentes de la faseolina que previamente se han descrito como secuencias con actividades inhibidora de la ECA y antioxidante. Así mismo, este hidrolizado presentó catequina (163,8 µg/g peso seco), pelargonidina 3-

Resultados

glucósido (88,5 µg/g p.s.) y ácido ferúlico (50,73 µg/g p.s.) como compuestos fenólicos mayoritarios. Así, la proteólisis asistida por APH es una estrategia más efectiva que la hidrólisis a presión atmosférica para la producción de hidrolizados funcionales a partir de proteínas de judía pinta.

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

High pressure-assisted enzymatic release of peptides and phenolics increase angiotensin converting enzyme I inhibitory and antioxidant activities of pinto bean hydrolysates

Journal:	<i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i>
Manuscript ID	jf-2015-06080p
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	23-Dec-2015
Complete List of Authors:	Garcia Mora, Patricia; ICTAN-CSIC, Peñas, Elena; Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Frias, Juana; CSIC, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN) Zielinski, Henryk; Institute of Animal Reproduction and Food Research of Polish Academy of Sciences , Division of Food Sciences Wiczkowski, Wieslaw; Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences , Department of Chemistry and Biodynamics of Food Zielinska, Danuta; University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Department of Chemistry Martinez-Villaluenga, Cristina; CSIC, ICTAN

SCHOLARONE™
Manuscripts

High pressure-assisted enzymatic release of peptides and phenolics increase angiotensin converting enzyme I inhibitory and antioxidant activities of pinto bean hydrolysates

Patricia Garcia-Mora^a, Elena Peñas^a, Juana Frias^a, Henryk Zieliński^b, Wiesław Wiczkowski^b, Danuta Zielińska^c, Cristina Martínez-Villaluenga^a

^aDepartment of Characterization, Quality and Safety, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Juan de la Cierva 3, Madrid 28006, Spain

^bDivision of Food Science, Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences, Tuwima 10, P.O. Box 55, 10-748 Olsztyn, Poland

^c Department of Chemistry, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Plac Lodzki 4, 10-727 Olsztyn, Poland

1 ABSTRACT

2 Pinto bean protein concentrate was hydrolysed by Alcalase or Savinase (0.1U/mg bean protein) at
3 0.1, 100 and 200 MPa at 50°C for 15 min. High pressure (HP) enhanced hydrolytic yield of both
4 subtilisins and significantly increased the content of low molecular weight peptides (<3 kDa),
5 flavonoids and total phenolic compounds. These positive effects of HP treatments improved
6 angiotensin I converting enzyme (ACE)-inhibitory and antioxidant activities of pinto bean
7 hydrolysates, although the optimal pressure level was found different for each enzyme treatment.
8 Alcalase hydrolysis at 100 MPa led to higher ACE inhibition, reducing power determined by cyclic
9 voltammetry and free radical scavenging activity of hydrolysates. However, hydrolysate obtained by
10 Savinase at 200 MPa showed the best ACE inhibitory and radical scavenging activities. HP-assisted
11 proteolysis by Savinase at 200 MPa was considered the most effective treatment to increase short
12 peptides, flavonoids, total phenolic compounds and oxygen radical absorbance capacity in
13 hydrolysates. In this hydrolysate, small phaseolin fragments with reported ACE-inhibitory and
14 antioxidant sequences were identified. Catechin (163.8 µg/g DW), pelargonidin 3-glucoside (88.5
15 µg/g DW) and ferulic acid (50.7 µg/g DW) were the main phenolic compounds. HP-assisted
16 hydrolysis of common bean protein concentrates would provide benefits in the production of
17 functional hydrolysates providing higher functionality and added value to the resulting hydrolysate
18 due to synergistic effects of bioactive peptides and soluble phenolics.

19

20 *Keywords:* pinto bean, high pressure-assisted proteolysis, bioactive peptides, phenolic compounds,
21 biological activity, reducing power, antioxidant activity

22 Abbreviations

23 AAE: Ascorbic acid equivalents; ABTS: 2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ACE:
24 Angiotensin I converting enzyme; CAE: Catechin equivalents; CV: cyclic voltammetry; CVD:

25 Cardiovascular diseases; DW: Dry weight; FAE: Ferulic acid equivalents; FRAP: Ferric reducing
26 antioxidant power; HAT: hydrogen atom transfer; ET: Electron transfer; IL-1 β : Interleukin 1 β ; IL-6
27 Interleukin 6; ORAC: Oxygen radical absorbance capacity; SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate
28 polyacrylamide gel electrophoresis; TE: Trolox equivalents; TP: Total phenolics; TF: Total
29 flavonoids

30 INTRODUCTION

31 Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), being an economically important legume crop (1), is widely
32 consumed worldwide. Common bean plays important nutrition functions and render significant
33 health promoting effects. Recent scientific studies provide evidences on the association of regular
34 consumption of common bean and derived products to lower risk of non-transmissible diseases
35 development including diabetes (2), cardiovascular diseases (3) obesity and metabolic syndrome (4)
36 and colorectal cancer (5, 6). These beneficial effects of common bean consumption are attributed to
37 its nutritional composition and bioactive compounds. Carbohydrates (composed mainly of starch and
38 fibre) are the main macronutrient of common bean (about 60% dry weight, dw) followed by protein
39 (about 23% dw) (2). Common bean proteins are sources of bioactive peptides which can be released
40 by enzymatic hydrolysis from their parent protein rendering antioxidant, antihypertensive, anticancer
41 and anti-inflammatory activities (7). Phenolics are also included among bioactive compounds of
42 common bean, being phenolic acids, flavan-3-ols, flavonols, flavanones and anthocyanidins the
43 major phenolic compounds in this legume (8). They generally occur as soluble (free and esterified)
44 or insoluble-bound forms, the latter representing a high percentage of the total phenolic content (8,
45 9). Scientific data evidence the potential of polyphenols to improve health through an array of
46 actions including antioxidant, anti-inflammatory, antihypertensive and anti-atherosclerotic activities
47 (10).

48 The convergence of the interesting bioactive profile of common bean joined to the increasing
49 evidences about its beneficial health effect has led researchers to seek new applications for this

50 legume such as the production of bioactive peptides (7). Common bean protein is a potential low cost
51 source for bioactive peptides, and, therefore, enzymatic hydrolysis of common bean proteins is a
52 suitable alternative for its exploitation as nutraceutical product or functional ingredient (11).
53 However, important challenges arise when preparing protein hydrolysates from this source, such as
54 the high resistance of phaseolin, the main seed storage protein, to enzymatic hydrolysis (12) and
55 those related to protein-phenolic interactions which might reduce hydrolytic efficiency or
56 hydrolysate bioactivity (13-15). To increase hydrolytic yields and maximize bean hydrolysates
57 functionality several strategies have been investigated including protein purification steps for
58 phenolic removal and thermal pre-treatments of isolated proteins (12) as well as sequential
59 hydrolysis with different enzymes (16). More recently, our research group demonstrated that pinto
60 bean proteolysis using Savinase 16 L, a commercial enzymatic preparation with protease and
61 esterase activities, was effective to release bioactive peptides, increasing at the same time soluble
62 phenolic content and functionality of the resulting hydrolysate (17).

63 Combination of high pressure (HP) and enzymatic hydrolysis is worth of consideration for bioactive
64 peptide production as it increases hydrolytic yields, reduce reaction times and production costs. This
65 technological strategy have successfully been applied to obtain bioactive peptides from ovalbumin
66 (18), pea (19, 20), chickpea (21) and lentil proteins (22); however, to the best of our knowledge there
67 is paucity of information on the application of HP assisted hydrolysis of common bean for bioactive
68 peptide production from common bean protein concentrates. HP treatments induce protein unfolding,
69 disruption of protein-phenolic interactions while enhance enzymatic proteolysis (23). Therefore, its
70 potential to improve extractability and bioavailability of phenolic compounds and functionality in the
71 production of hydrolysates from legume protein concentrates deserves further investigation. In this
72 context, the objective of this work was to study the impact of high pressure on the hydrolytic
73 efficiency of subtilisins (Alcalase and Savinase) to release bioactive peptides and phenolics from

74 pinto bean protein concentrate as well as on angiotensin converting enzyme (ACE) I inhibitory and
75 antioxidant activities of hydrolysates.

76 MATERIAL AND METHODS

77 **Chemicals and materials.** DC (detergent compatible) protein assay reagents were purchased from
78 Biorad-Laboratories (Hercules, CA, USA). Tripeptide Abz-Gly-Phe(NO₂)-Pro was purchased from
79 Cymit-Quimica (Barcelona, Spain). 2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate (ABTS), were
80 purchased from MERK Millipore (Germany). Reagents for gel electrophoresis were from Life
81 Technologies (CA, USA). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain)
82 unless otherwise specified.

83 Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* L. var. pinto) were provided by Semillas Iglesias S. A.
84 (Salamanca, Spain). Seeds were stored in polyethylene containers at 4 °C. Commercial food-grade
85 enzymes Alcalase[®] 2.4L FG (2.4 AU/g) and Savinase[®] (16 KNPU/g) were from Novozymes
86 (Bagsvaerd, Denmark).

87 Determination of protease and esterase activities in commercial enzymatic preparations.

88 Protease and esterase activities of Alcalase and Savinase were determined by a spectrophotometric
89 method using casein and *p*-nitrophenyl butyrate as the substrates (17). Protease activity was
90 expressed as U/mg protein, where units (U) are defined as μmol of tyrosine released from casein per
91 minute. Esterase activity was expressed as U/mg protein, where esterase units (U) are defined as
92 μmol of *p*-nitrophenol released from *p*-nitrophenyl butyrate per minute. Enzymatic assays were
93 performed in triplicate.

94 **Preparations of pinto bean protein concentrates.** Seeds were ground using a coffee mill
95 (Moulinex, Allenoçon, France) and passed through a 60-mesh sieve with 0.5 mm pore size. Protein
96 extraction was performed in water at pH 8 and using flour to solvent ratio of 1:10 (w/v). Flour
97 suspension (25 g flour in 250 mL of water at pH 8) was stirred at 20 °C in an orbital shaker during 1

98 h (Infors, Switzerland). Flour suspension was centrifuged at 10,000 x g for 15 min, and then,
99 vacuum-filtered using a filter funnel (100-160 μm nominal pore size). Finally, filtrates were freeze-
100 dried and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ under vacuum in plastic bags.

101 **High pressure (HP)-assisted proteolysis.** High pressure assisted proteolysis was carried out as
102 previously reported (22). Briefly, freeze-dried pinto bean protein extracts (0.5 g) were dispersed (2%,
103 w/v) in deionized water (25 mL) at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ and adjusted to pH 8 with 1 NaOH. HP treatment was
104 performed using a Stansted Fluid Power Iso-lab 900 High Pressure Food Processor (Model
105 FPG7100:9/2C, Stansted Fluid Power Ltd., Harlow, Essex, UK) with 3 L capacity, maximum
106 pressure of 900 MPa, and a potential maximum temperature of $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Enzymatic proteolysis was
107 carried out adding 0.1U of Alcalase and Savinase per mg of protein and different pressure levels
108 (100, 200 and 300 MPa). Pressure was increased at a rate of 600 MPa/min and maintained at the
109 desired pressure for a holding time of 15 min; the decompression time was less than 4 s. The
110 temperature of the pressure unit vessel was thermostatically controlled at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ throughout all the
111 treatments. The temperature of the pressure unit level was thermostatically controlled by a computer
112 program, being constantly monitored and recorded during the process. Control samples (without
113 enzyme) at atmospheric pressure (0.1 MPa) and 100, 200, and 300 MPa were also prepared.
114 Enzymatic reactions were stopped by heating at $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min. Finally, hydrolysates were
115 centrifuged at 14,000 rpm, at $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min, freeze-dried and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. HP-
116 assisted proteolysis and hydrolysis at atmospheric pressure were performed in triplicate.

117 **Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).** Protein profile of pinto
118 bean protein concentrate and hydrolysates were analysed by SDS-PAGE in NuPAGE® Novex 4-
119 12% Bis-Tris Gels. Electrophoresis was run in an XCell-sure lock Mini-Cell at 200 V under non-
120 reducing conditions. The running and sample buffers used were 1X NuPAGE® MES-SDS (800 mL),
121 and NuPAGE® LDS (1:4 sample to buffer ratio), respectively. Gels were stained with SimplyBlue

122 SafeStain (100 mL) for 1 h and destained (100 mL) in deionized water for 2 h. The Novex Sharp
123 Unstained Protein Standard (5 μ L) was used as molecular weight marker.

124 **Determination of protein and peptide content.** Soluble protein of samples was carried out in
125 triplicate using the DC (Detergent compatible) Protein Assay. Bovine serum albumin was used as
126 standard at a concentration range from 0.1 to 1 mg/mL. Peptide concentration was measured by the
127 DC Protein Assay in permeates obtained by ultrafiltration of samples through cellulose membranes
128 with 3 kDa molecular weight cut off (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Results were
129 expressed as mg/g sample in dry weight (DW).

130 **Determination of total polyphenol and flavonoid contents.** Total phenolic (TP) content was
131 determined in triplicate using a colorimetric method previously described by (24). The absorbance
132 was read at 725 nm in a spectrophotometer (UV-160 1PC, Shimadzu, Japan). TP content in samples
133 was calculated using standard curve prepared for ferulic acid (0.03–1 mg/mL) and the results were
134 expressed as mg of ferulic acid equivalents (FAE)/g DW. Total flavonoid (TF) content was
135 determined in triplicate according to (25). The absorbance was read at 510 nm in a
136 spectrophotometer (UV-160 1PC, Shimadzu, Japan). TF content in samples was calculated using (+)-
137 catechin as standard at a concentration range of 0.01–0.2 mg/mL and the results were expressed as
138 mg catechin equivalents (CAE)/g DW.

139 **Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC).** ORAC values of the protein hydrolysates and
140 controls were determined in triplicate following a previously reported method (26). Fluorescence
141 was measured in a microplate reader (Synergy HT, Biotek, USA) at 528 and 485 nm for emission
142 and excitation wavelengths, respectively. Different concentrations of Trolox (8–160 μ M) were used
143 to prepare a standard curve. Results were expressed as mmol Trolox equivalents (TE)/g sample DW.

144 **Ferric reducing antioxidant power (FRAP).** The FRAP of pinto bean hydrolysates was measured
145 according to (27). The absorbance was measured at 700 nm using spectrophotometer (UV-160 1PC,

146 Shimadzu, Japan). Data were obtained by interpolating the absorbance on a calibration curve
147 obtained with ascorbic acid (30–1,000 μM). Results were expressed as μmol of ascorbic acid
148 equivalents (AAE)/g sample DW.

149 **Scavenging of 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) radical cation (ABTS \bullet +) assay.** This assay was performed as described by (28). Measurements of absorbance at 734 nm were
150 carried out using the UV-160 temperature-controlled spectrophotometer with a CPS-Controller
151 (Shimadzu, Tokyo, Japan). The standard curve was plotted based on the length of the lag phase
152 versus Trolox concentrations within the range of 0.1–0.75 mM. The antioxidant capacity was
153 expressed as $\mu\text{mol TE/g}$ sample DW.

155 **Determination of reducing power by cyclic voltammetry (CV) assay.** This assay was performed
156 as it was previously reported by (29). A potentiostat (GAMRY, Warminster, PA, USA) and three-
157 electrode electrochemical cell were used for voltammetric experiments. Cyclic voltammetric
158 measurements were performed in ethanol/water (1:1, v/v) samples (40 mg/mL) mixed with 0,2 M
159 PBS buffer (pH 7,4) at a ratio of 1:1 (v/v). The cyclic voltammograms were acquired in the range of
160 -100 to +1200 mV at scanning rate of 100 mV s^{-1} and 2 mV intervals. Trolox solutions within the
161 concentration range of 0,1-1,5 mM were used and the results were expressed as $\mu\text{mol TE/ g DW}$.

162 **Determination of ACE inhibitory activity.** The ACE inhibitory activity was determined in
163 permeates < 3kDa of bean protein hydrolysates and control samples. Permeates were obtained after
164 ultrafiltration of samples through membranes of 3 kDa pore size (Millipore Corporation, Billerica,
165 MA, USA). Assays were performed in triplicate at a concentration of 1.5 mg/mL as previously
166 described (26). The IC_{50} values (concentration in mg DW/mL that inhibits 50% of the ACE activity)
167 of the most active hydrolysates were calculated by dose response-curves plotted in GraphPad Prism
168 4.00 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA).

169 **Extraction, identification and quantification of phenolic compounds by reversed phase high-**
170 **performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry.** About 0.1 g of
171 samples were extracted by sonication in 1 mL methanol/water (20/80, v/v) for 30 min at temperature
172 around 10°C. A second sample extraction was performed in 100% methanol as described above.
173 After extraction, samples were combined and centrifuged at 16,100 x g and 4 °C (Centrifuge 5415R,
174 Eppendorf, Germany) for 5 min and stored in a capped vial at 4°C until further analysis. Phenolic
175 compounds were identified and quantified using high performance liquid chromatography-
176 electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) as previously described (30,
177 31). All samples were filtered through a 0.45 µm PTFE syringe filter (Whatman INc., Florham Park,
178 NJ, USA) before injection. Samples (2 µL) were injected into a HPLC system (LC-200, Eksigent,
179 USA) equipped with a dual-channel pump, column oven, autosampler (set at 4°C) and system
180 controller link to Analyst 1.5.1 handling system. Chromatographic separation was conducted with a
181 HALO C₁₈ column (2.7 µm particles, 0.5 x 50 mm inner diameter, Eksigent, USA) at 45 °C at a flow
182 rate of 15 µL/min. The elution solvents were A (water/formic acid; 99.05/0.95; v/v) and B
183 (acetonitrile/formic acid, 99.05/0.95, v/v). The gradient was used as follows: 5% B for 0.1 min; 5-
184 90% B in 1.9 min and 90% B for 0.5 min. A reversed gradient consisting of 90-5% B in 0.2 min and
185 5% B for 0.3 min was carried out to clean the column and re-equilibration of the column.

186 For HPLC-MS/MS analysis a QTRAP 5500 ion trap mass spectrometer (AB SCIEX, USA) was
187 connected to the Eksigent LC200 via an ESI interface. Optimal ESI-MS/MS conditions of analysis
188 are presented in Supplementary Table 1. Qualitative and quantitative analysis were made using
189 Multiple Reaction Monitoring (MRM) method for appropriate external standards (Supplementary
190 Table 2). The calibration curves (the range of 1-100 nM) was linear with a correlation coefficient of
191 0.97.

192 **Identification of bioactive peptides by tandem nanoUPLC-ESI-MS.** For peptide identification, 10
193 µg of the most active hydrolysates were desalted using a reverse phase (PorosR2[®]) column with 80%

194 acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid. Later, the peptides were dried and resuspended with 10 μ L
195 0.1% TFA. An aliquot of 5 μ L of resuspended sample were injected in the linear trap quadrupole
196 Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Peptides were loaded onto a C18-A1 ASY-Column 2 cm
197 precolumn (Thermo Scientific) and then eluted onto a Biosphere C18 column (inner diameter 75 μ m,
198 15 cm long, 3 μ m particle size) (NanoSeparations) at a flow rate of 250 nL/min on a nanoEasy high-
199 performance liquid chromatography (Proxeon) coupled to a nanoelectrospray ion source (Proxeon).

200 The mobile phases used consisted of 0.1% formic acid/2% acetonitrile (solvent A) and 0.1%
201 formic acid in 100% acetonitrile (solvent B). The solvent gradient was from 0% B to 35% B in 140
202 min. Mass spectra were acquired in the positive ion mode. Full-scan MS spectra (m/z 400-1800)
203 were acquired with a target value of 1,000,000 at a resolution of 30,000 at m/z 400 and the 15 most
204 intense ions were selected for collision induced dissociation fragmentation in the linear trap
205 quadrupole with a target value of 10,000 and normalized collision energy of 38%. Precursor ion
206 charge state screening and monoisotopic precursor selection were enabled. Singly charged ions and
207 unassigned charge states were rejected. Dynamic exclusion was enabled with a repeat count of 1 and
208 exclusion duration of 30s.

209 Proteome Discoverer 1.4.288 (Thermo) with MASCOT 2.3 was used to search in NCBI
210 database, taxonomy Viridiplantae (1530236 sequences) and a home-made database with the
211 *Phaseolus vulgaris* entries in UniProt. Database search parameters used were the following: peptide
212 tolerance, 10 ppm; fragment ion tolerance, 0.8 Da; none enzyme and variable modification,
213 methionine oxidation. In all peptide identification, the probability scores were greater than the score
214 fixed by Mascot as significant with a *p*-value < 0.05. The automatic decoy database search function
215 of Protein Discover was enabled to allow estimation of false discovery rate (FDR). Sequence
216 identification with reported biological activity was compared with bioactive peptides sequences
217 submitted to the BIOPEP database (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>).

218 **Statistical analysis.** Statistical analysis was conducted using Statgraphics Centurion XVI software,
219 version 16.1.17 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, Md). Group mean comparisons were
220 conducted using Duncan's multiple-range test and were considered significant at $P < 0.05$ based on
221 the minimum significant differences from one-way analysis of variance (ANOVA) with $\alpha =$
222 0.05. Results are presented as means \pm standard deviation. All analyses were done at least in
223 triplicate. The correlation between all bioactivities measured and peptides < 3 kDa, total phenolics
224 and flavonoid content were analysed using Statgraphics Centurion XVI software, version 16.1.17
225 and statistical significance was reported at $P < 0.05$.

226 **RESULTS AND DISCUSSION**

227 **Effect of pressurization on soluble protein content and protein profiles of pinto protein**
228 **concentrates.** Protein solubility may be negatively affected as consequence of HP treatment due to
229 HP-induced protein aggregation which ultimately reduces hydrolytic yield (21). Therefore, soluble
230 protein concentration was measured after HP treatment in pinto bean protein concentrates. Soluble
231 protein contents in HP-treated protein concentrates at 100, 200 and 300 MPa were not significantly
232 different (average value 9.0 ± 0.70 mg/mL) from non-HP treated sample (8.4 ± 0.8 mg/mL). This result
233 indicates that at the pressure levels assayed insoluble protein aggregation did not occur. Secondly,
234 protein profile of protein concentrates was determined to discard the formation of soluble protein
235 aggregates at the pressure levels applied. Figure 1 shows the main protein bands found in non HP-
236 treated pinto bean protein concentrate (Control 0.1 MPa). These bands were tentatively identified as
237 linoleate 9S lipoxygenase 1 (95 kDa; Band A), legumin (70 kDa; Band B), phaseolin (40 and 53
238 kDa; Bands D and C, respectively), lectin (33 kDa; Band E), arcelin-4 (29 kDa; Band F),
239 phytohemagglutinin (25 kDa; Band G), trypsin inhibitor (20 kDa; Band H), α -amylase inhibitor (18
240 kDa; Band I), α -amylase inhibitor \square (16 and 18 kDa; Bands K and J, respectively) and Bowman-
241 Birk proteinase type inhibitor (9.9 kDa; Band L) based on references from the literature (12, 32).
242 Pressurization at 100 and 200 MPa did not affect the protein profile of pinto bean concentrates

243 (Figure 1), but pressurization at 300 MPa led to the disappearance of high molecular weight protein
244 bands such as linoleate 9S lipoxygenase 1 and legumin and reduced the intensity of phaseolin
245 subunits (data not shown). These results suggest the formation of soluble protein aggregates induced
246 by high pressure treatment as it has been reported previously for lentil, chickpea and red kidney bean
247 proteins (21, 22, 33). HP treatment at 200-600 MPa can improve protein solubility of a red kidney
248 bean protein isolate rich in vicilin via the formation of soluble aggregates (33). HP treatment
249 produces gradual unfolding of kidney bean vicilins, and formation of disulfide bonds from free
250 sulfhydryl groups that favor protein aggregation. However, HP induced vicilin protein aggregation
251 above 200 MPa have shown to have a negative impact in *in vitro* trypsin digestibility (Yin et al.,
252 2008). Therefore, based on our results HP-assisted enzymatic proteolysis was only carried out at 100
253 and 200 MPa.

254 **Effect of pressurisation on enzymatic hydrolysis of pinto bean proteins and peptide production.**

255 Enzymatic hydrolysis at atmospheric pressure (0.1 MPa) for 15 min completely degraded or reduced
256 the intensity of protein bands with high molecular weight (95-50 kDa; Figure 1), although it is worth
257 noting that Alcalase showed a higher hydrolytic efficiency than Savinase in agreement with our
258 previous study (17). Although phaseolin (Bands C and D) have shown stability to enzymatic
259 treatments due to its compact and glycosylated structure (32), the significant reduced intensity of this
260 protein observed after Alcalase and Savinase hydrolysis for 15 min confirms the suitability of these
261 enzymes in the production of common bean hydrolysates (Figure 1). As compared to digestion at 0.1
262 MPa, HP-assisted proteolysis of pinto bean by both subtilisins enhanced hydrolytic yield and the
263 release of protein fragments with molecular weights < 15 kDa (Figure 1). This observation is
264 consistent with previous results, showing that pressurization (100-200 MPa) of pea proteins during
265 enzyme treatments accelerated their hydrolysis by subtilisins (20, 34). Increased conformational
266 flexibility of enzymes and changes in reaction mechanism induced by HP may lead to an improved
267 overall reaction rate (35). In addition, proteins may increase its susceptibility to proteolysis during

268 HP treatments due to protein denaturation and oligomeric dissociation that lead to exposure of new
269 cleavage sites. For instance, Chao et al. (2013) demonstrated that pressurized isolated pea proteins at
270 200 MPa and 24°C for 5 min had a 15% increased level of exposed hydrophobic residues. The effect
271 of HP on protein conformation is related to destabilization of non-covalent interactions. Hydrophobic
272 interactions, playing a major role in the stabilization of the tertiary structure and protein-protein
273 interactions, are the most pressure sensitive followed by ionic and hydrogen bonds (36). In addition,
274 the entry of water molecules inside the protein matrix seems also to play a major role in high
275 pressure denaturation process (36).

276 Bioactive peptides are short amino acid sequences composed of 2 to 20 amino acid residues
277 (37). To study the effectiveness of HP-assisted proteolysis in the release of small peptides from pinto
278 bean proteins, peptide content in 3 kDa permeates of pinto bean hydrolysates was measured (Table
279 1). Alcalase and Savinase hydrolysis at 0.1 MPa for 15 min produced a remarkable increase in the
280 concentration of peptides < 3 kDa as compared to bean protein concentrate in agreement with our
281 previous study (17). Proteolysis under HP increased in a more extent the yield of peptides < 3 kDa.
282 Our results are similar to previous reports showing higher yields of low molecular weight peptides in
283 bean (33) and chickpea (21) and lentil (22) hydrolysates obtained by HP-assisted proteolysis (100-
284 300 MPa).

285 Moreover, it is worth to note that the higher the pressure level applied, the higher
286 concentration of peptides < 3 kDa was found in pinto bean hydrolysates produced by Savinase, as it
287 was previously observed in lentil (Garcia-Mora et al., 2015b). In contrast, Alcalase hydrolysis at 200
288 MPa brought about hydrolysates with a lower content of peptides < 3 kDa compared to those
289 obtained at 100 MPa ($P < 0.05$). A previous work has also shown that increases in the pressure level
290 led to substantial differences in molecular weight distribution of hydrolysates produced by Alcalase.
291 For example, pressures of 400 and 600 MPa give rise to hydrolysates with more high molecular
292 weight peptides than hydrolysates from 200 MPa (20). Substantial differences observed between

293 pinto bean hydrolysates produced by Alcalase and Savinase with respect to their peptide (<3kDa)
294 content might be due to differences in enzyme specificity and the magnitude of catalytic activity
295 increase as consequence of pressure level.

296 Savinase proteolysis at 200 MPa and 50°C for 15 min gave rise to the highest yield of
297 peptides < 3kDa in pinto bean hydrolysates (465 mg/g). As compared to Savinase and Alcalase
298 proteolysis of pinto bean at atmospheric pressure and 50°C, higher peptide (<3kDa) yields are only
299 achieved with extended hydrolysis times of 120 min (508 and 544 mg/g for Savinase and Alcalase
300 pinto bean hydrolysates, respectively) (17). This observation indicates that HP assisted proteolysis is
301 a more efficient processing to produce pinto bean hydrolysates enriched in small peptides (<3kDa).

302 **Effect of HP-assisted proteolysis on total phenolics and flavonoids of pinto bean hydrolysates.**

303 The total phenolic and flavonoid contents of Alcalase and Savinase pinto bean hydrolysates
304 produced at different pressure levels is shown in Table 1. Total phenolic content of hydrolysates
305 produced by Alcalase and Savinase at 0.1 MPa was higher as compared to untreated pinto bean
306 concentrates, which is attributed to the release of bound phenolics as consequence of protein
307 breakdown (38). However, total flavonoid content was not affected by enzymatic treatments at 0.1
308 MPa. Therefore, the increased phenolic content observed in hydrolysates at 0.1 MPa is probably due
309 to a proteolysis-induced release of non-flavonoid compounds. This finding is consistent with a recent
310 report concluding that enzymes cleavage chemical bonds between phenolics and proteins, thus
311 promoting the release of phenolics, especially phenolic acids that are major constituents of the cell
312 walls (39). In fact, pinto bean proteolysis by Savinase was more effective increasing the
313 concentration of total phenolic content in pinto bean hydrolysates which may be partially explained
314 due to its higher esterase activity (17). Enzymes with esterase activity are involved in the hydrolysis
315 of phenolic acids bound with ester linkages to proteins (40).

316 HP favored the release of phenolics during enzymatic proteolysis (Table 1). Total phenolic
317 concentration in pinto bean hydrolysates increased with pressure level to reach 10.11 and 10.80 mg

318 FAE/g for Alcalase and Savinase treatments at 200 MPa, respectively. Alcalase treatment under HP
319 did not affect total flavonoid content of pinto bean hydrolysates. In contrast, Savinase hydrolysis
320 either at 100 and 200 MPa improved total flavonoid content in pinto bean hydrolysates. It is worth to
321 note that HP assisted proteolysis by Savinase at 200 MPa give rise to pinto bean hydrolysates with
322 the highest total phenolic (10.8 mg FAE/g) and flavonoid content (4.55 mg CAE/g). Comparing
323 these results with our previous study on pinto bean proteolysis by Savinase at atmospheric pressure,
324 longer incubation time (90 min) was needed to observe a slightly increase in total phenolics
325 concentration (12.9 mg FAE/g) of hydrolysates; however, no improvement for total flavonoid
326 content in savinase hydrolysates was found at longer reaction times (30-120 min) (17). Similarly to
327 small peptides production, HP-assisted proteolysis is a more efficient processing to increase the
328 concentration of soluble phenolics in legume protein hydrolysates. The positive effect of HP-assisted
329 proteolysis on total phenolic content may be attributed to the combination of both pressure-induced
330 disruption of native phenolic-protein interactions and pressure-enhanced catalytic activity of
331 enzymes related to protein breakdown and release of non-extractable phenolics (for example,
332 esterase activity). Various studies have found a significant increased yield of polyphenols after HP
333 treatment in different plant food materials and by-products (23). HP may provoke disruption of food
334 matrix and activation of endogeneous enzymes able to hydrolyze macromolecular nutrients both
335 releasing polyphenols associated with macromolecules or encapsulated in the food matrix
336 (Rodríguez-Roque et al., 2015).

337 **Effect of HP-assisted proteolysis on ACE-inhibitory activity of pinto bean hydrolysates.** Figure
338 2 shows ACE-inhibitory activity of 3 kDa permeates from pinto bean hydrolysates produced by
339 subtilisins at different pressure levels. Untreated pinto bean protein concentrates showed a weak
340 ACE inhibitory activity (23% inhibition vs. control). Alcalase and Savinase digestions at 0.1 MPa for
341 15 min significantly increased the ACE inhibitory activity of the 3 kDa fraction (36.02 and 38.12%
342 inhibition, respectively). Although, higher ACE inhibition values (60% inhibition on average) were

343 achieved in Alcalase and Savinase pinto bean hydrolysates at longer hydrolysis times (60-120 min)
344 (17).

345 HP-assisted proteolysis affected differently the ACE inhibitory activity of hydrolysates
346 produced by Alcalase and Savinase. Alcalase digestion either at 100 and 200 MPa increased ACE-
347 inhibitory activity of hydrolysates (49 and 45% ACE inhibition, respectively) while only Savinase
348 treatments at 200 MPa resulted in an improved ACE-inhibitory activity of the fraction <3kDa (50.3%
349 ACE inhibition). IC_{50} values for the most potent fractions >3 kDa of pinto bean hydrolysates
350 produced by Alcalase at 100 MPa ($IC_{50}=0.27$ mg/mL) and Savinase at 200 MPa ($IC_{50}=0.28$ mg/mL)
351 were found similar to those reported for 3 kDa permeates from Alcalase ($IC_{50}=0.26$ mg/mL) and
352 Savinase ($IC_{50}=0.23$ mg/mL) pinto bean hydrolysates obtained at 0.1 MPa for 120 and 90 min,
353 respectively (17). Moreover, IC_{50} values reported in the present study are within the range reported in
354 literature for common bean protein hydrolysates produced by different enzymes at 0.1 MPa and
355 longer hydrolysis times (7). Therefore, HP assisted proteolysis is more efficient than hydrolysis at
356 atmospheric pressure to maximize the antihypertensive potential of pinto bean hydrolysates through
357 a favored release of peptides and phenolics with ACE-inhibitory activity. Significant positive
358 correlations were found between ACE-inhibitory activity vs. content of total phenolics and
359 flavonoids for Alcalase ($r = 0.706$ and 0.9284) and Savinase ($r = 0.6829$ and 0.9592) hydrolysates,
360 which suggests that phenolic compounds are contributing to ACE-inhibitory activity of bean
361 hydrolysates.

362 **Effect of high pressure (HP)-assisted proteolysis on antioxidant activity of bean hydrolysates.**

363 Antioxidant activity of pinto bean hydrolysates produced by subtilisins at different pressure levels
364 was evaluated using five different methods (Table 2). ORAC is a method widely used to test the
365 hydrogen atom donating activity of antioxidant compounds (41). Enzymatic hydrolysis at 0.1 MPa
366 for 15 min did not affect ORAC values of pinto bean hydrolysates. In contrast, our previous study
367 showed that longer Alcalase and Savinase treatments (30-120 min) significantly improve ORAC

368 values of pinto bean hydrolysates (17). HP-assisted proteolysis had both positive and negative effects
369 on ORAC depending on the enzyme and pressure level applied. Alcalase hydrolysates produced at
370 100 MPa showed similar ORAC values compared to hydrolysates obtained at 0.1 MPa, whereas at
371 higher pressure level (200 MPa) ORAC values decreased. Unlike Alcalase treatments, oxygen
372 radical scavenging activity of pinto bean hydrolysates obtained with Savinase increased as HP level
373 was increased. Thus, there was a difference in protein cleavage patterns when HP-assisted
374 proteolysis was subjected by Alcalase or Savinase. It seems that HP induce the exposure of Savinase-
375 susceptible cleavage sites in pinto bean proteins that led to increased release of compounds with H-
376 donating capacity. Comparing all treatments, HP-assisted Savinase digestion at 200 MPa gave rise to
377 pinto bean hydrolysates with the highest ORAC values (348.9 mmol TE/g). This value is higher than
378 reported ORAC values in hydrolysates produced from lentil protein concentrates by Savinase at 200
379 MPa for 5 min (22), pinto bean protein concentrate obtained at 0.1 MPa for longer incubation times
380 (30-120 min) (17) and Pinto Durango and Negro 8025 common bean varieties digested by Alcalase
381 or pepsin-pancreatin at 0.1 MPa for 180 min (42).

382 ABTS radical scavenging activity (ARSA) is based on mixed hydrogen atom transfer and
383 electron transfer mechanisms (43). ARSA of hydrolysates was markedly increased by HP-assisted
384 proteolysis regardless of the enzyme used and pressure level applied. In fact, both enzymatic
385 treatments at 100 MPa and Savinase digestion at 200 MPa gave rise to the highest ARSA in pinto
386 bean hydrolysates (0.40 mmol TE/g, on average). The fact that 100 and 200 MPa was associated
387 with improved ARSA suggests that the protein conformational changes caused by HP treatment
388 favored enzymatic release with ABTS scavenging compounds from pinto bean proteins. The ARSA
389 values observed in the present work are lower than reported values for common bean hydrolysates
390 (16, 44, 45). Differences in common bean varieties, the use of different proteases, reaction conditions
391 (temperature, pH, time, enzyme/substrate ratio, pressure level) may have been responsible for the
392 observed variations in ARSA of common bean hydrolysates. Reducing power antioxidant

393 mechanisms is related to breakdown of free radical chains through the donation of electrons or
394 hydrogen atoms (46). Reducing power of hydrolysates was measured in this study by two different
395 methods, FRAP and CV. FRAP was determined by measuring the conversion of Fe^{3+} /ferricyanide
396 complex to form ferrous ions in the presence of electron or hydrogen donating compounds. Table 2
397 shows that similar FRAP values were found in hydrolysates produced under HP when compared to
398 hydrolysates obtained at 0.1 MPa. Therefore, HP-assisted proteolysis by subtilisins did not favor the
399 release of compounds that can reduce Fe^{3+} to ferrous ions. Similar results were observed previously
400 for hydrolysates obtained by Alcalase digestion of pressurized pea protein isolates at 200, 400 and
401 600 MPa (19). The FRAP values obtained in this work are lower than the range reported for pinto
402 bean hydrolysates digested by Alcalase (64-72 $\mu\text{mol TE/g}$) and Savinase (67-71 $\mu\text{mol TE/g}$) at 0.1
403 MPa for a time period of 30-120 min (17). Similarly, the ability of hydrolysates to donate electrons
404 evaluated by CV was not enhanced when enzymatic hydrolysis was performed under HP apart from
405 Alcalase treatments at 100 MPa that significantly improved reducing power of pinto bean
406 hydrolysates (28 $\mu\text{mol TE/g}$). In comparison to HP-assisted proteolysis, extended hydrolysis at 0.1
407 MPa (30-120 min) did not improve reducing power of pinto bean hydrolysates (17).

408 The positive effect of HP assisted proteolysis on antioxidant activity of pinto bean
409 hydrolysates could be related to production of low molecular weight peptides as observed previously
410 in chickpea hydrolysates (21), but also to release of non-extractable phenolic compounds with
411 hydrogen atom donating capacity. This statement was supported by significant positive correlations
412 found in the present work between antioxidant activity of Alcalase (measured as ARSA, reducing
413 power) and Savinase (determined as ORAC and ARSA) hydrolysates and their total phenolic,
414 flavonoid and peptides < 3 kDa concentrations.

415 **Phenolic and peptide profile of the most active pinto bean hydrolysates produced by HP-**
416 **assisted proteolysis.** Bean hydrolysate obtained by Savinase at 200 MPa was selected for further

417 characterization of the peptide and phenolic profile based on its higher content of peptides < 3kDa,
418 total flavonoids and ORAC values.

419 *Peptide identification*

420 As compared to high molecular weight polypeptides, small peptides (<3 kDa) are generally
421 considered the main contributors to the ACE inhibitory and antioxidant activity of protein
422 hydrolysates. For these reason, peptide characterization by LC-ESI-MS/MS was performed in the 3
423 kDa permeate from the selected bean hydrolysate. The most abundant amino acid sequences
424 identified in 3 kDa permeates are shown in Table 3. These peptides belong to the seed storage
425 protein phaseolin and those pointed out in Table 3 with an asterisk were also found in hydrolysates
426 produced by Savinase at 0.1 MPa for 90 min (17).

427 Potential biological activity of these peptides was determined *in silico* using BIOPEP Database
428 (Minckiewicz et al., 2008). Several ACE-inhibitory (underlined) and antioxidant (highlighted in grey
429 colour) amino acid sequences were observed within the primary structure of these peptides.
430 Furthermore, identified peptides fulfilled some structural features of C-terminal region reported for
431 ACE-inhibitory peptides (47). These include the presence of proline, bulky hydrophobic residues,
432 aromatic or branched chains, at position 1 or more positions, positively charged amino acids (Arg,
433 Lys) at position 2 and aromatic amino acids (Tyr, Phe, Trp) at position 3. On the other hand, the
434 presence of basic (His, Arg) and aromatic amino acids (Trp, Tyr, Phe) in the sequence of identified
435 phaseolin peptides could contribute to their antioxidant activity, since phenolic, indole and imidazole
436 groups present in the amino acid residues aforementioned, act as proton donors (48). The specific
437 position of amino acids in the peptide sequence may also contribute to its bioactivity. It has been
438 demonstrated that antioxidant peptides can contain hydrophobic amino acid residues such as Val,
439 Leu, Ile or Ala at both N-terminus and C-terminus and polar/charged amino acids (His or Arg) at the
440 C-terminus position (49). Moreover, His as well as Asp and Glu are able to bind metals by their
441 imidazol ring and charged residues, respectively; hence, being important for inhibition of metal-

442 mediated oxidation processes and metal chelating properties (50). In summary, the presence of these
443 amino acids in the sequence of the identified phaseolin peptides might be contributing to the
444 antioxidant activity observed for selected pinto bean hydrolysate.

445 *Phenolic profile*

446 Table 4 shows the individual profile of pinto bean protein concentrate and hydrolysate produced with
447 Savinase at 200 MPa. All individual phenolic compounds identified in pinto bean protein
448 concentrates were already reported for extracts from 24 common bean varieties(8). In general,
449 phenolic compounds present in Savinase-digested hydrolysate at 200 MPa were higher than those
450 found in bean protein concentrate. Total flavanols content was three-fold higher in the hydrolysate in
451 comparison with the untreated sample. HP-assisted proteolysis caused a 4-fold increase in the
452 catechin amount while it drastically reduced by 50% epicatechin content. Catechin was the most
453 abundant compound in the pinto bean hydrolysate (163.8 $\mu\text{g/g DW}$) representing 66% of the total
454 phenolic content. Concerning flavonol content, pinto bean hydrolysates showed significantly higher
455 concentration (26.6 $\mu\text{g/g DW}$) than un-hydrolyzed protein concentrate (15.2 $\mu\text{g/g DW}$). The analysis
456 of the individual flavonols showed quercetin 3-glucoside as the major flavonol, representing 4.6% of
457 the total phenolic content. Other minor compounds including quercetin aglycone and diglycosides
458 and malonylglucosides, isorhamnetine, myricetin and kaempferol glucosides were also present at
459 higher concentrations after HP-assisted proteolysis. According to our results, total anthocyanin
460 content increased 4-fold in Savinase-digested hydrolysates at 200 MPa (104.3 $\mu\text{g/g DW}$) as
461 compared to protein concentrate (20.1 $\mu\text{g/g DW}$). The most abundant anthocyanin was pelargonidin
462 3-glucoside, representing 85% of the total anthocyanin content. Total hydroxycinnamic acids were
463 increased by 53% in pinto bean hydrolysate (55.0 $\mu\text{g/g DW}$). Ferulic acid represented 97% of total
464 hydroxycinnamic acids while *p*-coumaric and sinapic acids were also detected as minor compounds.

465 Increased concentrations of individual phenolic acids and flavonoids observed in pinto bean
466 hydrolysates could be explained by HP-assisted enzymatic release of bound phenolic compounds. In

467 this sense, previous studies reported increased concentrations of phenolic acids, flavonols and
468 flavanols in HP treated fruit and soybean-based beverages (23, 51). Moreover, significant increases
469 of anthocyanins glucosides and aglycones have been found in pressurized grape by-products (200-
470 600 MPa, 20-70°C, 30-90 min) (52, 53). The positive effect of HP on phenolics concentrations are
471 related to disruption of non-covalent protein-protein and protein-polyphenol interactions, protein
472 unfolding and enhanced catalytic activity (protease and esterase) that led to release of non-
473 extractable phenolic compounds bound to pinto bean proteins. Similarly, increased catechin amounts
474 found in pinto bean hydrolysates may be explained by HP-assisted enzymatic release of non-
475 extractable proanthocyanidins and subsequent depolymerization induced by alkaline pH (54).

476 Phenolic compounds identified in hydrolysates may be also contributors to the bioactivity of
477 hydrolysates. Structure activity studies have shown that p-coumaric and ferulic acid have a stronger
478 free radical-scavenging, transition metal-chelating, and singlet oxygen quenching capacity) than
479 other cinnamic and hydroxybenzoic acid derivatives (43) while catechin and epicatechin have been
480 found among the most potent flavonoids inhibiting ACE-inhibitory activity *in vitro* (55).

481

482 In summary, as compared to proteolysis at atmospheric pressure, HP assisted proteolysis is a more
483 effective processing enhancing pinto bean proteolysis to release small peptides (<3kDa) and phenolic
484 compounds. HP-assisted proteolysis by Savinase at 200 MPa was considered the most effective
485 treatment to increase short peptides, flavonoids and phenolic acids in pinto bean hydrolysates. These
486 positive effects of HP-assisted proteolysis were associated to improvements in the ACE inhibitory
487 and radical scavenging activities of hydrolysates. HP-assisted hydrolysis of common bean protein
488 concentrates would provide benefits in the production of functional hydrolysates by avoiding the
489 incorporation of protein purification steps and providing higher functionality and added value to the
490 resulting hydrolysate due to synergistic effects of bioactive peptides and soluble phenolics.

491 **AUTHOR INFORMATION**

492 Corresponding author: Tel.: + 34 91 2587601. E-mail: c.m.villaluenga@csic.es (C. Martinez-
493 Villaluenga)

494 **Funding**

495 This work has received financial support (project AGL2010-16310 and AGL2013-43247-R) from
496 Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO, Spain) and FEDER programme from the
497 European Commission. E. P. and P. G-M. acknowledge Ministry of Economy and Competitiveness
498 for their “Ramón y Cajal” and FPI contract, respectively.

499 **Notes**

500 The authors declare no conflict of interest.

501 **REFERENCES**

- 502 1. Food and Agricultural Organization Statistics (FAOSTAT). 2014.
503 <http://faostat.fao.org/site339default.aspx> (Accessed 20.08.15)
- 504 2. Olmedilla-Alonso, B.; Pedrosa, M. M.; Cuadrado, C.; Brito, M.; Asensio-S-Manzanera, C.;
505 Asensio-Vegas, C., Composition of two Spanish common dry beans (*Phaseolus vulgaris*),
506 'Almonga' and 'Curruquilla', and their postprandial effect in type 2 diabetics. *Journal of the*
507 *Science of Food and Agriculture* **2013**, *93*, 1076-1082.
- 508 3. Zhu, Z.; Jiang, W.; Thompson, H. J., Edible dry bean consumption (*Phaseolus vulgaris* L.)
509 modulates cardiovascular risk factors and diet-induced obesity in rats and mice. *British*
510 *Journal of Nutrition* **2012**, *108*, S66-S73.
- 511 4. Nilsson, A.; Johansson, E.; Ekström, L.; Björck, I., Effects of a Brown Beans Evening Meal
512 on Metabolic Risk Markers and Appetite Regulating Hormones at a Subsequent Standardized
513 Breakfast: A Randomized Cross-Over Study. *PLoS ONE* **2013**, *8*.

- 514 5. Borresen, E. C.; Gundlach, K. A.; Wdowik, M.; Rao, S.; Brown, R. J.; Ryan, E. P.,
515 Feasibility of increased navy bean powder consumption for primary and secondary colorectal
516 cancer prevention. *Current Nutrition and Food Science* **2014**, *10*, 112-119.
- 517 6. Campos-Vega, R.; García-Gasca, T.; Guevara-Gonzalez, R.; Ramos-Gomez, M.; Oomah, B.
518 D.; Loarca-Piña, G., Human gut flora-fermented nondigestible fraction from cooked bean
519 (phaseolus vulgaris l.) modifies protein expression associated with apoptosis, cell cycle
520 arrest, and proliferation in human adenocarcinoma colon cancer cells. *Journal of Agricultural
521 and Food Chemistry* **2012**, *60*, 12443-12450.
- 522 7. Luna-Vital, D. A.; Mojica, L.; González de Mejía, E.; Mendoza, S.; Loarca-Piña, G.,
523 Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (Phaseolus
524 vulgaris L.): A review. *Food Research International* **2015**, *76*, Part 1, 39-50.
- 525 8. Lin, L.-Z.; Harnly, J. M.; Pastor-Corrales, M. S.; Luthria, D. L., The polyphenolic profiles of
526 common bean (Phaseolus vulgaris L.). *Food Chemistry* **2008**, *107*, 399-410.
- 527 9. Luthria, D. L.; Pastor-Corrales, M. A., Phenolic acids content of fifteen dry edible bean
528 (Phaseolus vulgaris L.) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis* **2006**, *19*, 205-
529 211.
- 530 10. Del Rio, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Spencer, J. P. E.; Tognolini, M.; Borges, G.; Crozier, A.,
531 Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of
532 protective effects against chronic diseases. *Antioxidants and Redox Signaling* **2013**, *18*, 1818-
533 1892.
- 534 11. Hayat, I.; Ahmad, A.; Masud, T.; Ahmed, A.; Bashir, S., Nutritional and Health Perspectives
535 of Beans (Phaseolus vulgaris L.): An Overview. *Critical Reviews in Food Science and
536 Nutrition* **2014**, *54*, 580-592.

- 537 12. Rui, X.; Boye, J. I.; Simpson, B. K.; Prasher, S. O., Angiotensin I-converting enzyme
538 inhibitory properties of Phaseolus vulgaris bean hydrolysates: Effects of different thermal and
539 enzymatic digestion treatments. *Food Research International* **2012**, *49*, 739-746.
- 540 13. Flurkey, A.; Cooksey, J.; Reddy, A.; Spoonmore, K.; Rescigno, A.; Inlow, J.; Flurkey, W. H.,
541 Enzyme, protein, carbohydrate, and phenolic contaminants in commercial tyrosinase
542 preparations: Potential problems affecting tyrosinase activity and inhibition studies. *Journal*
543 *of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 4760-4768.
- 544 14. Tan, S. H.; Mailer, R. J.; Blanchard, C. L.; Agboola, S. O., Canola Proteins for Human
545 Consumption: Extraction, Profile, and Functional Properties. *Journal of Food Science* **2011**,
546 *76*, R16-R28.
- 547 15. Hernández-Jabalera, A.; Cortés-Giraldo, I.; Dávila-Ortíz, G.; Vioque, J.; Alaiz, M.; Girón-
548 Calle, J.; Megías, C.; Jiménez-Martínez, C., Influence of peptides-phenolics interaction on
549 the antioxidant profile of protein hydrolysates from Brassica napus. *Food Chemistry* **2015**,
550 *178*, 346-357.
- 551 16. Betancur-Ancona, D.; Sosa-Espinoza, T.; Ruiz-Ruiz, J.; Segura-Campos, M.; Chel-Guerrero,
552 L., Enzymatic hydrolysis of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein concentrates
553 and its effects on biological and functional properties. *International Journal of Food Science*
554 *& Technology* **2014**, *49*, 2-8.
- 555 17. Garcia-Mora, P.; Frias, J.; Peñas, E.; Zieliński, H.; Giménez-Bastida, J. A.; Wiczowski, W.;
556 Zielińska, D.; Martínez-Villaluenga, C., Simultaneous release of peptides and phenolics with
557 antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities from pinto bean (*Phaseolus*
558 *vulgaris* L. var. pinto) proteins by subtilisins. *Journal of Functional Foods* **2015**, *18*, Part A,
559 319-332.

- 560 18. Quirós, A.; Chichón, R.; Recio, I.; López-Fandiño, R., The use of high hydrostatic pressure to
561 promote the proteolysis and release of bioactive peptides from ovalbumin. *Food Chemistry*
562 **2007**, *104*, 1734-1739.
- 563 19. Girgih, A. T.; Chao, D.; Lin, L.; He, R.; Jung, S.; Aluko, R. E., Enzymatic protein
564 hydrolysates from high pressure-pretreated isolated pea proteins have better antioxidant
565 properties than similar hydrolysates produced from heat pretreatment. *Food Chemistry* **2015**,
566 *188*, 510-516.
- 567 20. Chao, D.; He, R.; Jung, S.; Aluko, R. E., Effect of pressure or temperature pretreatment of
568 isolated pea protein on properties of the enzymatic hydrolysates. *Food Research*
569 *International* **2013**, *54*, 1528-1534.
- 570 21. Zhang, T.; Jiang, B.; Miao, M.; Mu, W.; Li, Y., Combined effects of high-pressure and
571 enzymatic treatments on the hydrolysis of chickpea protein isolates and antioxidant activity
572 of the hydrolysates. *Food Chemistry* **2012**, *135*, 904-912.
- 573 22. Garcia-Mora, P.; Peñas, E.; Frias, J.; Gomez, R.; Martinez-Villaluenga, C., High-pressure
574 improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin i converting
575 enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins. *Food Chemistry* **2015**, *171*,
576 224-232.
- 577 23. Barba, F. J.; Terefe, N. S.; Buckow, R.; Knorr, D.; Orlie, V., New opportunities and
578 perspectives of high pressure treatment to improve health and safety attributes of foods. A
579 review. *Food Research International* **2015**, *77*, Part 4, 725-742.
- 580 24. Przygodzka, M.; Zielińska, D.; Ciesarová, Z.; Kukurová, K.; Zieliński, H., Comparison of
581 methods for evaluation of the antioxidant capacity and phenolic compounds in common
582 spices. *LWT - Food Science and Technology* **2014**, *58*, 321-326.

- 583 25. Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W., The determination of flavonoid contents in
584 mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* **1999**, *64*, 555-
585 559.
- 586 26. Garcia-Mora, P.; Peñas, E.; Frias, J.; Martínez-Villaluenga, C., Savinase, the most suitable
587 enzyme for releasing peptides from lentil (*Lens culinaris* var. Castellana) protein concentrates
588 with multifunctional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62*, 4166-
589 4174.
- 590 27. Liyana-Pathirana, C. M.; Shahidi, F., The antioxidant potential of milling fractions from
591 breadwheat and durum. *Journal of Cereal Science* **2007**, *45*, 238-247.
- 592 28. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C., Antioxidant
593 activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical*
594 *Biology and Medicine* **1999**, *26*, 1231-1237.
- 595 29. Zielinska, D.; Frias, J.; Piskula, M. K.; Kozłowska, H.; Zielinski, H.; Vidal-Valverde, C.,
596 Evaluation of the antioxidant capacity of lupin sprouts germinated in the presence of
597 selenium. *European Food Research and Technology* **2008**, *227*, 1711-1720.
- 598 30. Wiczowski, W.; Szawara-Nowak, D.; Topolska, J., Changes in the content and composition
599 of anthocyanins in red cabbage and its antioxidant capacity during fermentation, storage and
600 stewing. *Food Chemistry* **2015**, *167*, 115-123.
- 601 31. Wiczowski, W.; Topolska, J.; Honke, J., Anthocyanins profile and antioxidant capacity of
602 red cabbages are influenced by genotype and vegetation period. *Journal of Functional Foods*
603 **2014**, *7*, 201-211.
- 604 32. Mojica, L.; de Mejía, E. G., Characterization and Comparison of Protein and Peptide Profiles
605 and their Biological Activities of Improved Common Bean Cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.)
606 from Mexico and Brazil. *Plant Foods for Human Nutrition* **2015**.

- 607 33. Yin, S. W.; Tang, C. H.; Wen, Q. B.; Yang, X. Q.; Li, L., Functional properties and in vitro
608 trypsin digestibility of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate: Effect of high-
609 pressure treatment. *Food Chem* **2008**, *110*, 938-45.
- 610 34. Zhang, T.; Jiang, B.; Miao, M.; Mu, W.; Li, Y., Combined effects of high-pressure and
611 enzymatic treatments on the hydrolysis of chickpea protein isolates and antioxidant activity
612 of the hydrolysates. *Food Chem* **2012**, *135*, 904-12.
- 613 35. Luong, T. Q.; Winter, R., Combined pressure and cosolvent effects on enzyme activity - a
614 high-pressure stopped-flow kinetic study on alpha-chymotrypsin. *Physical chemistry
615 chemical physics : PCCP* **2015**, *17*, 23273-8.
- 616 36. Rivalain, N.; Roquain, J.; Demazeau, G., Development of high hydrostatic pressure in
617 biosciences: pressure effect on biological structures and potential applications in
618 biotechnologies. *Biotechnology advances* **2010**, *28*, 659-72.
- 619 37. Udenigwe, C. C.; Aluko, R. E., Food protein-derived bioactive peptides: production,
620 processing, and potential health benefits. *J Food Sci* **2012**, *77*, R11-24.
- 621 38. Acosta-Estrada, B. A.; Gutierrez-Urbe, J. A.; Serna-Saldivar, S. O., Bound phenolics in
622 foods, a review. *Food Chem* **2014**, *152*, 46-55.
- 623 39. Ti, H.; Zhang, R.; Li, Q.; Wei, Z.; Zhang, M., Effects of cooking and in vitro digestion of rice
624 on phenolic profiles and antioxidant activity. *Food Research International* **2015**, *76*, Part 3,
625 813-820.
- 626 40. Pérez-Jiménez, J.; Torres, J. L., Analysis of Nonextractable Phenolic Compounds in Foods:
627 The Current State of the Art. *Journal of agricultural and food chemistry* **2011**, *59*, 12713-
628 12724.
- 629 41. Zheng, L.; Su, G.; Ren, J.; Gu, L.; You, L.; Zhao, M., Isolation and characterization of an
630 oxygen radical absorbance activity peptide from defatted peanut meal hydrolysate and its
631 antioxidant properties. *Journal of agricultural and food chemistry* **2012**, *60*, 5431-7.

- 632 42. Oseguera-Toledo, M. E.; de Mejia, E. G.; Dia, V. P.; Amaya-Llano, S. L., Common bean
633 (Phaseolus vulgaris L.) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-induced macrophages
634 through suppression of NF-kappaB pathways. *Food Chem* **2011**, *127*, 1175-85.
- 635 43. Craft, B. D.; Kerrihard, A. L.; Amarowicz, R.; Pegg, R. B., Phenol-Based Antioxidants and
636 the In Vitro Methods Used for Their Assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science
637 and Food Safety* **2012**, *11*, 148-173.
- 638 44. Ariza-Ortega, T. d.; Zenón-Briones, E.; Castrejón-Flores, J.; Yáñez-Fernández, J.; Gómez-
639 Gómez, Y. d. l.; Oliver-Salvador, M. d., Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory,
640 antimicrobial, and antioxidant effect of bioactive peptides obtained from different varieties of
641 common beans (Phaseolus vulgaris L.) with in vivo antihypertensive activity in
642 spontaneously hypertensive rats. *Eur Food Res Technol* **2014**, *239*, 785-794.
- 643 45. Valdez-Ortiz, A.; Fuentes-Gutiérrez, C. I.; Germán-Báez, L. J.; Gutiérrez-Dorado, R.;
644 Medina-Godoy, S., Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur yellow) beans
645 (Phaseolus vulgaris): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization. *LWT -
646 Food Science and Technology* **2012**, *46*, 91-96.
- 647 46. Prasad, K. N.; Yang, E.; Yi, C.; Zhao, M.; Jiang, Y., Effects of high pressure extraction on
648 the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp.
649 *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2009**, *10*, 155-159.
- 650 47. Norris, R.; Harnedy, P. A.; FitzGerald, R. J., Antihypertensive Peptides from Marine Sources.
651 In *Bioactive Compounds from Marine Foods*, John Wiley & Sons Ltd: 2013; pp 27-56.
- 652 48. Sarmadi, B. H.; Ismail, A., Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*
653 **2010**, *31*, 1949-1956.
- 654 49. Li, Y. W.; Li, B., Characterization of structure-antioxidant activity relationship of peptides in
655 free radical systems using QSAR models: Key sequence positions and their amino acid
656 properties. *Journal of Theoretical Biology* **2013**, *318*, 29-43.

- 657 50. Torres-Fuentes, C.; Alaiz, M.; Vioque, J., Chickpea chelating peptides inhibit copper-
658 mediated lipid peroxidation. *Journal of the science of food and agriculture* **2014**, *94*, 3181-8.
- 659 51. Rodríguez-Roque, M. J.; de Ancos, B.; Sánchez-Moreno, C.; Cano, M. P.; Elez-Martínez, P.;
660 Martín-Belloso, O., Impact of food matrix and processing on the in vitro bioaccessibility of
661 vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based
662 beverages. *Journal of Functional Foods* **2015**, *14*, 33-43.
- 663 52. Corrales, M.; García, A. F.; Butz, P.; Tauscher, B., Extraction of anthocyanins from grape
664 skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering* **2009**, *90*, 415-421.
- 665 53. Corrales, M.; Toepfl, S.; Butz, P.; Knorr, D.; Tauscher, B., Extraction of anthocyanins from
666 grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields:
667 A comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2008**, *9*, 85-91.
- 668 54. Pérez-Jiménez, J.; Díaz-Rubio, M. E.; Saura-Calixto, F., Non-extractable polyphenols in
669 plant foods: Nature, isolation, and analysis. In *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification*
670 *and Extract Preparation*, 2014; pp 203-218.
- 671 55. Guerrero, L.; Castillo, J.; Quinones, M.; Garcia-Vallve, S.; Arola, L.; Pujadas, G.; Muguerra,
672 B., Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: structure-activity
673 relationship studies. *PloS one* **2012**, *7*, e49493.
- 674

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Sodium-dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) protein profiles of pinto bean protein concentrate (control) at 0.1, 100 and 200 MPa and hydrolysates produced by Alcalase and Savinase at the same pressure levels for 15 min. Letters refer to proteins tentatively identified based on references from literature (12, 32). A: linoleate 9S Lipoxigenase 1; B: legumin; C and D: subunits of phaseolin; E: lectin; F: arcelin-4; G: phytohemagglutinin; H: trypsin inhibitor; I: α -amilase inhibitor; J and K: α -amilase inhibitor β ; L: Bowman-Birk type proteinase inhibitor. STD: Novex® Sharp unstained protein standard (Life Technologies, Madrid, Spain)

Figure 2. ACE-inhibitory activity of < 3 kDa fraction from bean protein hydrolysates produced by subtilisins (Alcalase and Savinase at different pressures). C (+) indicates ACE inhibition displayed by captopril at 0.1 μ M. Each bar corresponds to the mean of two independent experiments with error bars indicating the standard deviation. The permeate concentration in the analysis was 0.25 mg DW/mL. Different letters indicate significant differences among treatments ($P \leq 0.05$, Duncan test).

Figure 1

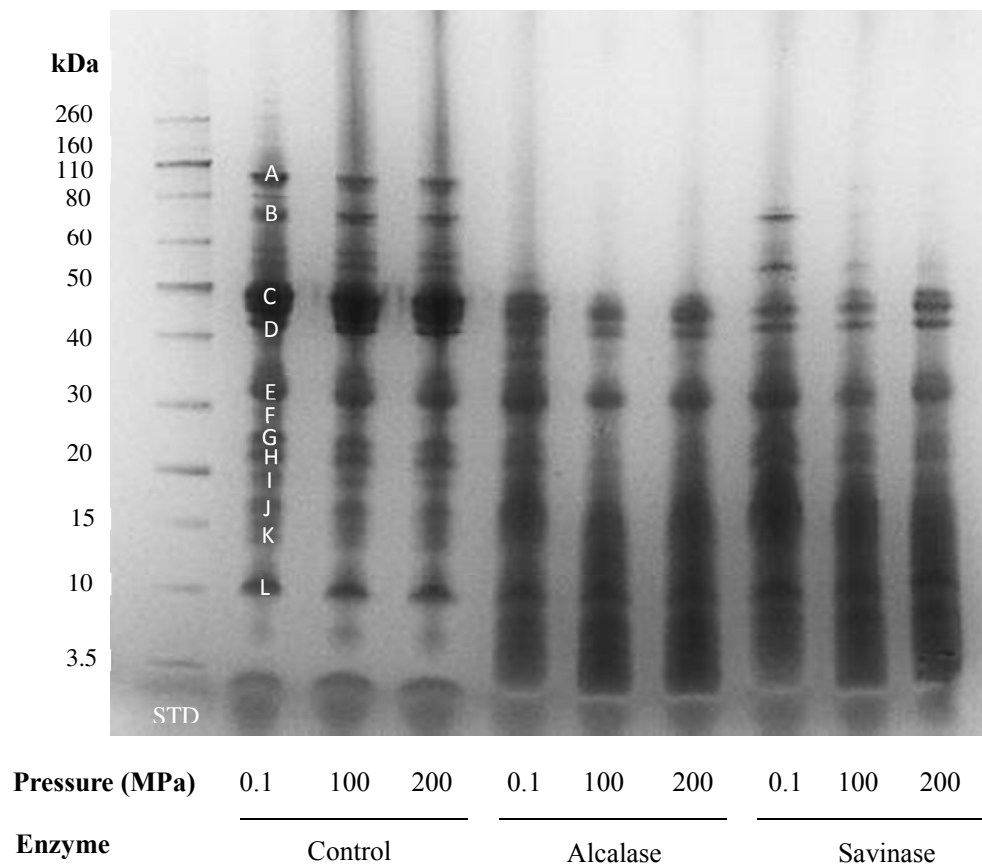


Figure 2.

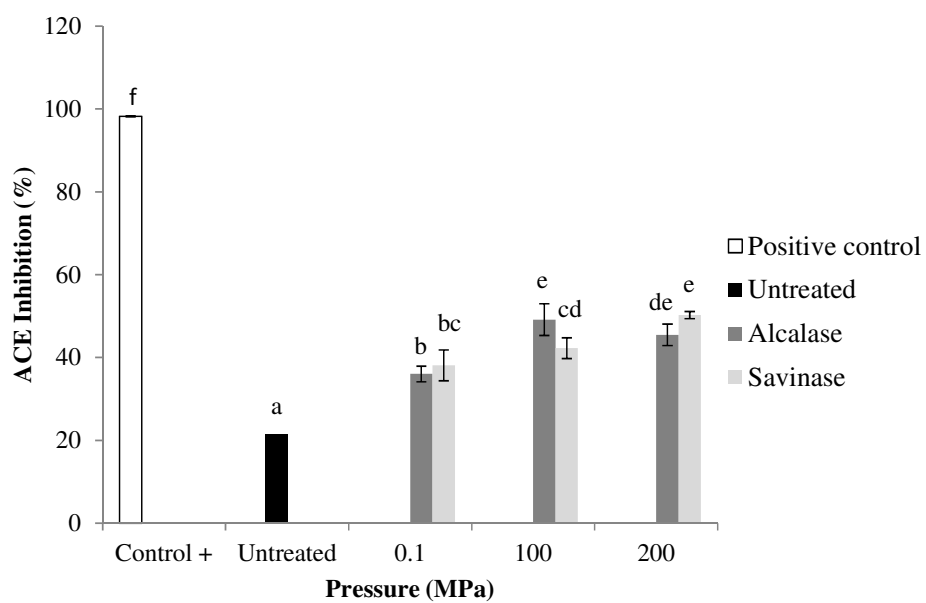


Table 1. Peptides (< 3 kDa), total phenolics and total flavonoids contents of pinto bean hydrolysates produced by HP-assisted enzymatic proteolysis at different pressures

Enzymatic treatment	Pressure (MPa)	Peptides < 3 kDa (mg/g)	Total phenolics (mg FAE/g)	Total flavonoids (mg CAE/g)
Untreated	0.1	61.19±4.74a	5.48±0.28a	3.53±0.02bc
Alcalase	0.1	121.15±9.5c	7.38±0.05b	3.08±0.12a
	100	368.78±22.85e	8.89±0.64c	3.62±0.34bc
	200	318.78±39.44c	10.11±0.64de	3.56±0.19bc
Savinase	0.1	85.44±3.14b	9.17±0.65cd	3.35±0.30ab
	100	411.19±40.12e	10.12±0.28de	4.33±0.07de
	200	465±34.57f	10.80±0.98e	4.55±0.23e

pressures

Data indicate mean value ± standard deviation of two independent experiments. Different letters indicate significant differences within columns ($P \leq 0.05$, Duncan test)

Table 2. Antioxidant activity of pinto bean hydrolysates produced by subtilisins at different pressure levels

Enzymatic treatment	Pressure (MPa)	ORAC (mmol TE/g)	ABTS (mmol TE/g)	FRAP ($\mu\text{mol AAE/g}$)	CV ($\mu\text{mol TE/g}$)
Untreated	0.1	276.45 \pm 0.47a	0.17 \pm 0.02a	68.58 \pm 0.91bc	20.73 \pm 0.9b
Alcalase	0.1	300.41 \pm 29.42b	0.24 \pm 0.02b	63.06 \pm 0.52ab	15.96 \pm 0.35a
	100	314.08 \pm 14.66b	0.41 \pm 0.00d	65.94 \pm 0.61bc	28.27 \pm 0.25d
	200	263.05 \pm 13.00a	0.37 \pm 0.02c	61.70 \pm 0.45a	14.86 \pm 0.11a
Savinase	0.1	269.01 \pm 23.42a	0.26 \pm 0.00b	64.82 \pm 0.11ab	24.19 \pm 0.06bc
	100	319.41 \pm 24.38b	0.40 \pm 0.02d	62.74 \pm 0.57a	25.30 \pm 0.06cd
	200	348.89 \pm 20.14c	0.41 \pm 0.02d	64.26 \pm 0.23ab	21.46 \pm 0.55b

Data indicate mean value \pm standard deviation of two independent experiments. Different letters indicate significant differences within columns ($P \leq 0.05$, Duncan test)

Table 3. Most abundant peptides found in the most active pinto bean hydrolysates.

SAVINASE 200 MPa			
Protein	Accession	Peptide sequence ¹	MH+ [Da]
α -type phaseolin precursor	21036	*TSLREEEESQDNPFYFN	2104,91
Chain A of phaseolin	640273	*FNSKFEEINRVL	1495,79
β -type phaseolin storage protein	169323	*SLREEEESQDNPFYFN	2003,86
Hypothetical protein PHAVU_007G0597001g, partial	561016477	*YLVNPDPKEDLRRIQL	1926,08
		*VNPDPKEDLRRIQL	1649,93
		STEAQQSYLQEF	1430,64
		*SKRLQNLLEDYRLVEF	1910,01
		*ILEASFNSKFEEINRVL	2009,07
		*SDNSWNTLFKNQYGHIRVL	2292,15
		*RAELSKDDVFVIPAAYPVAIK	2302,28
		YYSKAIIVLVNNEGEAHVE	2133,12
		VVNEGEAHVE	1082,51
		ILEASFNSKF	1155,60
α -type phaseolin precursor	21036	*FEEEGQQEEGQEGVIV	1934,87
β -type phaseolin storage protein	169323		
Hypothetical protein PHAVU_007G0597001g, partial	561016477		
α -type phaseolin precursor	21036	*SIGRALDGKDV LGL	1413,81
Chain A of phaseolin	640273	*DNVISSIGRALDGKDV LGL	1942,06
β -type phaseolin storage protein	169323	AmPVNNPQIHEFFLS	1759,85
		AMPVNNPQIHEFFLS	1743,85
α -type phaseolin precursor	21036	SIEmKEGALFVPH	1473,74
Hypothetical protein PHAVU_007G0597001g, partial	561016477	*VVNEGEAHVELVGPKNKETLEFESY	2874,42
		*SIEMKEGALFVPH	1457,75
		*LVGPKNKETLEFESY	1810,92
α -type phaseolin precursor	21036	*GDNPIFSDNQKIPAGTIFYL	2210,11
		*GDNPIFSDNQKIPAGTIF	1933,97

Chain A of phaseolin	640273	*SIEMEEGAL <u>FVPH</u>	1458,69
β -type phaseolin storage protein	169323	SIEmEEGAL <u>FVPH</u>	1474,69
		*VVNEGE <u>AH</u> VELVGPKGNKETLEYESY	2890,42
		<u>TF</u> SGSGDEVMKL <u>INKQ</u>	1753,88
		*ISSIEMEEGAL <u>FVPH</u>	1658,81
		TFSGSGDEVMKL <u>INKQ</u> SGSYFV <u>DAH</u>	2717,29
		SGSYFV <u>DAH</u>	982,43
α -type phaseolin precursor	21036	SSIEMKEGAL <u>FVPH</u>	1544,78
hypothetical protein PHAVU_007G0597001g, partial	561016477	ISSIEMKEGAL <u>FVPH</u>	1657,86

¹ Underlined and highlighted portion of the sequence found to be part of the peptide with reported antioxidant and ACE inhibitory activities, respectively in BIOPEP Database (Minckiewicz et al., 2008).

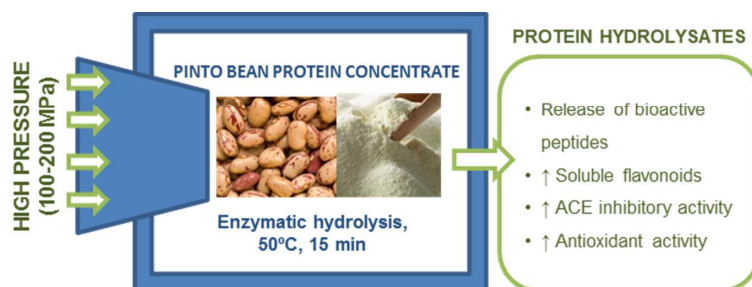
*Peptides also identified in pinto bean hydrolysates produced with Savinase at atmospheric pressure for 90 min (Garcia-Mora et al., 2015b)

Table 4. Quantitative analysis of individual phenolic compounds ($\mu\text{g/g DW}$) identified in pinto bean concentrate (untreated sample) and hydrolysate produced by Savinase at 200 MPa.

	UNTREATED	SAVINASE, 200 MPa
Catechin	41.24 \pm 1.48 ^a	163.76 \pm 0.43 ^b
Epicatechin	15.23 \pm 0.11 ^b	7.65 \pm 0.05 ^a
<i>Total flavanols</i>	56.47 \pm 1.59 ^a	171.41 \pm 3.45 ^b
Quercetin 3-glucoside	8.28 \pm 0.42 ^a	16.17 \pm 0.08 ^b
Quercetin	1.60 \pm 0.05 ^a	1.92 \pm 0.00 ^b
Isorhamnetine 3-rutinoside	0.81 \pm 0.03 ^a	1.68 \pm 0.00 ^b
Myricetin 3-glucoside	0.75 \pm 0.05 ^a	2.02 \pm 0.00 ^b
Quercetin 3-xylosylglucoside	0.79 \pm 0.00 ^a	1.24 \pm 0.01 ^b
Quercetin 3-malonylglucoside	1.87 \pm 0.06 ^a	2.02 \pm 0.01 ^a
Kaempferol 3-malonylglucoside	1.10 \pm 0.03 ^a	1.55 \pm 0.00 ^b
<i>Total flavonols</i>	15.20 \pm 0.48 ^a	26.61 \pm 0.99 ^a
Cyanidin 3-glucoside	1.92 \pm 0.00 ^a	4.73 \pm 0.02 ^b
Cyanidin	0.87 \pm 0.01 ^a	1.70 \pm 0.01 ^b
Cyanidin 3-rutinoside	0.75 \pm 0.00 ^a	1.05 \pm 0.00 ^b
Delphinidin 3-glucoside	0.91 \pm 0.00 ^a	1.10 \pm 0.00 ^b
Pelargonidin diglucoside	1.08 \pm 0.00 ^a	1.50 \pm 0.01 ^b
Malvidin 3-glucoside	0.69 \pm 0.01 ^b	0.55 \pm 0.00 ^a
Pelargonidin 3-glucoside	16.11 \pm 0.44 ^a	88.46 \pm 0.00 ^b
Cyanidin 3-malonylglucoside	1.10 \pm 0.01 ^a	1.66 \pm 0.02 ^b
Pelargonidin 3-malonylglucoside	2.63 \pm 0.01 ^a	3.52 \pm 0.01 ^b
<i>Total anthocyanins</i>	26.06 \pm 0.41 ^a	104.26 \pm 1.29 ^b
<i>p</i> -Coumaric acid	1.00 \pm 0.01 ^a	3.86 \pm 0.07 ^b
Sinapic acid	0.21 \pm 0.01 ^a	0.35 \pm 0.00 ^b
Ferulic acid	28.24 \pm 0.08 ^a	50.73 \pm 0.13 ^b
<i>Total hydroxycinnamic acids</i>	26.06 \pm 0.41 ^a	54.95 \pm 1.43 ^b
Total phenolics	127.18\pm2.58^a	357.23\pm7.16^b

Data indicate mean value \pm standard deviation. Different letters within a row are significantly different ($P < 0.05$, Duncan test).

TOC



Discusión general

5. Discusión general

En los últimos años, los hábitos de consumo en los países desarrollados han cambiado debido a la mayor concienciación por parte del consumidor de la estrecha relación entre la dieta y la salud. De hecho, los consumidores en la actualidad ven los alimentos no solo como una herramienta para satisfacer el hambre y proporcionar los nutrientes necesarios, sino además como un modo de mejorar el bienestar físico y la salud (Siro y col., 2008). A pesar de ello, los patrones alimentarios de la población Europea se alejan progresivamente de una dieta saludable. Este fenómeno unido al estilo de vida cada vez más sedentario es responsable del aumento de la incidencia de enfermedades crónicas como la hipertensión y otras patologías cardiovasculares. Por este motivo, durante las dos últimas décadas, la industria alimentaria ha dirigido gran parte de sus esfuerzos al desarrollo de alimentos funcionales, que contienen ingredientes bioactivos desarrollados tecnológicamente, y que están encaminados a ejercer un efecto beneficioso específico sobre una o más funciones fisiológicas del organismo, más allá de sus efectos nutricionales (Niva, 2007). Estos alimentos no sólo satisfacen las demandas del consumidor de alimentos más saludables y de mayor calidad nutricional, sino que además pueden contribuir a la prevención de enfermedades crónicas de gran repercusión socioeconómica.

Las proteínas de origen alimentario constituyen una alternativa eficiente y económica para la producción de ingredientes/alimentos funcionales. Mediante procesos de hidrólisis *in vitro* o digestión gastrointestinal, las proteínas liberan péptidos bioactivos que pueden ejercer efectos positivos en el organismo. En este escenario, las leguminosas representan una fuente proteica económica y sostenible para la producción de péptidos bioactivos, además de ser ricas en compuestos fenólicos (Boye y col., 2010; Rebello y col., 2014). Esta composición sugiere el gran potencial de las leguminosas para la producción de ingredientes o alimentos con diversas actividades biológicas dirigidos al control de la presión sanguínea.

En este capítulo se discutirán los resultados obtenidos en la presente memoria, donde se ha evaluado, en primer lugar, la efectividad del proceso de hidrólisis enzimática como estrategia tecnológica para potenciar la liberación de péptidos multifuncionales y compuestos fenólicos a partir de concentrados proteicos de lentejas (Publicaciones I y II) y judías (Publicación III). En segundo lugar, se discutirán los resultados relativos al estudio de la viabilidad de la aplicación de las APH en combinación con el proceso de hidrólisis enzimática para la producción de hidrolizados ricos en péptidos bioactivos y compuestos fenólicos a partir de concentrados proteicos de ambas leguminosas (Publicaciones IV y V).

5.1. Producción y caracterización de hidrolizados proteicos multifuncionales a partir de lenteja castellana mediante hidrólisis con proteasas de grado alimentario.

El aumento creciente de la hipertensión a nivel mundial ha llevado a la búsqueda de estrategias efectivas para paliar este problema. Debido a que tanto el estrés oxidativo como la ECA juegan un papel fundamental en el desarrollo de la hipertensión (Hong y col., 2008; Bagatini y col., 2011), el desarrollo de ingredientes/alimentos funcionales con actividades antioxidante e inhibidora de la ECA podría constituir una estrategia alternativa al tratamiento farmacológico para el control y la prevención de esta patología. Diversos estudios muestran el empleo de péptidos bioactivos obtenidos a partir de proteínas animales (huevo, carne, pescado y leche) como potenciales agentes antihipertensivos (Hernández-Ledesma y col., 2011). Sin embargo los estudios realizados para la obtención de péptidos antihipertensivos a partir de proteínas vegetales son escasos.

La primera parte del trabajo que se presenta en esta memoria ha consistido en el uso del proceso de hidrólisis enzimática como herramienta para la producción de hidrolizados proteicos multifuncionales con actividades inhibidora de la ECA y antioxidante a partir de concentrados proteicos de lenteja obtenidos mediante extracción alcalina. Se ha elegido esta leguminosa por su alto contenido proteico (20-30%) (Duranti, 2006) y porque estudios

previos han demostrado que es precursora de péptidos con actividad inhibidora de la ECA (Boye y col., 2010; Barbana y Boye, 2011). Debido a que la composición y bioactividad de los hidrolizados va a depender del tipo de enzima empleada y tiempo de hidrólisis en la hidrólisis, en este estudio se utilizaron cuatro proteasas de grado alimentario (Alcalasa, Savinasa, Protamex y Corolasa 7089) y se realizaron diferentes tratamientos (0, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 min).

Con el fin de evaluar la eficiencia hidrolítica de las enzimas empleadas en función del tiempo de reacción sobre las proteínas de lenteja, se determinó el grado de hidrólisis proteica mediante la cuantificación del número de grupos amino liberados durante el proceso. Los resultados pusieron de manifiesto que el grado de hidrólisis de las proteínas de lenteja dependió tanto del tipo de proteasa como del tiempo de hidrólisis. Alcalasa y Savinasa mostraron una eficiencia proteolítica significativamente superior a Corolasa 7089 y Protamex, resultados que pueden atribuirse a la diferente especificidad de las enzimas. Alcalasa y Savinasa son subtilisinias, serán proteasas extracelulares producidas por bacterias del género *Bacillus* (Gupta y col., 2002) que tienen una amplia especificidad de sustrato. Así mismo, el grado de hidrólisis de las proteínas de lenteja aumentó gradualmente con el tiempo de digestión, hasta alcanzar el plateau a las 4 h de hidrólisis con Corolasa 7089 y a las 5 h de hidrólisis con Alcalasa, Savinasa y Protamex.

El análisis del perfil electroforético de los hidrolizados proteicos de lenteja también puso de manifiesto que Alcalasa y Savinasa fueron las proteasas más efectivas, ya que causaron la hidrólisis de las principales proteínas de lenteja (vicilina, convicilina y albúmina) durante la primera hora de tratamiento, produciendo la acumulación de péptidos menores de 10 y 14 kDa, respectivamente. En el caso de la hidrólisis con Alcalasa, no se apreciaron diferencias significativas en el perfil proteico de los hidrolizados entre 1 y 3 h de hidrólisis, si bien a partir de la cuarta hora se produjo una mayor hidrólisis proteica con producción de péptidos menores de 6 kDa. Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores, que han mostrado la eficacia de la Alcalasa en la producción de péptidos menores de 10 kDa a partir

de garbanzo (Yust y col., 2003) y judía (Rui y col., 2012; Hernandez-Alvarez y col., 2013). Con respecto a la Savinasa, a medida que aumentó el tiempo de hidrólisis se produjo la degradación de los polipéptidos de mayor peso molecular, así como de los péptidos menores de 14 kDa, sugiriendo su degradación a péptidos más pequeños. En contraste, la hidrólisis con Protamex y Corolasa 7089 fue menos efectiva, resultados en concordancia con los observados durante la evaluación del grado de hidrólisis proteica. Ambas proteasas causaron la degradación parcial de las proteínas de lenteja, si bien no se apreciaron diferencias significativas entre 1 y 6 h de tratamiento. Es importante señalar que la resistencia de las proteínas de lenteja a ambas enzimas proteolíticas ha sido descrita por primera vez en este estudio (Publicación I).

Una vez conocido el efecto del tiempo de hidrólisis y el tipo de proteasa en la degradación de las proteínas de lenteja, nos propusimos evaluar la actividad biológica de los hidrolizados obtenidos. En particular, se determinaron las actividades inhibidora de la ECA y antioxidante de los hidrolizados, por ser dos de los mecanismos implicados en la patología hipertensiva (Crowley y Coffman, 2012). Se ha descrito que los péptidos inhibidores de la ECA son generalmente secuencias cortas de aminoácidos, ya que moléculas grandes no se pueden acomodar en el centro activo de esta enzima (Sirtori y col., 2009). Por este motivo, los hidrolizados proteicos de lenteja producidos se ultrafiltraron por membranas de diámetro de poro de 3 kDa y los permeados obtenidos se emplearon para el análisis de la actividad inhibidora de la ECA. Los concentrados proteicos de lenteja mostraron una débil actividad inhibidora de esta enzima, si bien se observó un aumento de la misma tras la hidrólisis, que dependió tanto del tipo de proteasa como del tiempo de hidrólisis. Los hidrolizados obtenidos con Alcalasa y Savinasa mostraron porcentajes de inhibición muy superiores a los obtenidos con Protamex y Corolasa 7089, independientemente del tiempo de hidrólisis. La eficacia inhibitoria de la ECA está directamente asociada con la longitud y secuencia de la cadena peptídica. Se ha demostrado que secuencias peptídicas cortas (de 3 a 12 residuos aminoácidos) que contienen Tyr, Phe, Pro o aminoácidos aromáticos son las

que presentan mayor actividad inhibidora de la ECA (Erdmann y col., 2008). Las enzimas Alcalasa y Savinasa produjeron hidrolizados proteicos con mayor proporción de secuencias peptídicas cortas a juzgar por su perfil electroforético, hecho que, junto con su especificidad por residuos aromáticos o hidrofóbicos en posición P1 (Gupta y col., 2002), explicaría su mayor eficacia inhibitoria de esta enzima en comparación con las otras dos enzimas empleadas. La actividad inhibidora de la ECA de los hidrolizados de lenteja aumentó gradualmente con el tiempo de hidrólisis, alcanzándose los máximos valores de inhibición entre 1 y 3 h de hidrólisis, dependiendo de la enzima. Tiempos de reacción mayores, sin embargo, causaron un descenso de la misma, fenómeno que podría atribuirse a la degradación de las secuencias de aminoácidos activas. Los hidrolizados obtenidos con Savinasa y Alcalasa después de 2 y 3 h de hidrólisis, respectivamente, fueron los que presentaron mayor actividad inhibidora de la ECA. Por este motivo, se calculó en ambos hidrolizados el valor de IC_{50} , que se define como la concentración de digerido capaz de inhibir el 50% de la actividad de la ECA. El hidrolizado obtenido con Savinasa a las 2 h (S2) mostró un valor de IC_{50} significativamente inferior al del hidrolizado producido con Alcalasa a las 3 h (A3), indicando una actividad inhibidora superior en el hidrolizado con Savinasa. Estos resultados sugieren que la Savinasa podría originar secuencias peptídicas más activas que la Alcalasa. Ésta es la primera evidencia científica que demuestra la eficacia de la enzima Savinasa para liberar péptidos inhibidores de la ECA a partir de proteínas de leguminosas. Los valores de IC_{50} obtenidos en esta Tesis fueron inferiores a los observados por otros autores en hidrolizados proteicos de lenteja obtenidos con diversas enzimas (Jakubczyk y Baraniak, 2013). Así mismo, la actividad inhibidora de la ECA encontrada en el hidrolizado S2 es similar a la mostrada previamente en hidrolizados de lenteja roja y verde obtenidos con Alcalasa/Flavourzyme, bromelaína y papaína durante tiempos superiores de hidrólisis (8 h) (Barbana y Boye, 2011). Nuestros resultados, junto con los datos existentes en la bibliografía, sugieren el gran potencial de los hidrolizados S2 y A3 para el control de la presión sanguínea.

Otro de los objetivos planteados en la presente Tesis Doctoral fue evaluar el efecto del tiempo de hidrólisis y del tipo de proteasa empleada en la actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos de lenteja obtenidos. Para ello se empleó el método fluorimétrico ORAC que refleja la capacidad de atrapar radicales peroxilo. Este método se basa en la transferencia de átomos de hidrógeno entre los compuestos antioxidantes presentes en la muestra y radicales peroxilo (ROO^\cdot) generados en el ensayo. Nuestros resultados indicaron que la actividad antioxidante de los hidrolizados fue muy superior a la del concentrado proteico de lenteja. Además, el tiempo de hidrólisis y el tipo de proteasa tuvieron gran influencia en la actividad antioxidante de los hidrolizados. Los obtenidos con Alcalasa, Savinasa y Corolasa 7089 mostraron un aumento progresivo de los valores de ORAC a medida que aumentó el tiempo de proteólisis, alcanzando los valores máximos a las 4, 2 y 3 h, respectivamente. Sin embargo, los hidrolizados producidos con Protamex mostraron la mayor actividad antioxidante tras 1 h de hidrólisis, apreciándose una disminución de esta actividad a tiempos de hidrólisis superiores. La diversa actividad antioxidante observada entre los diferentes tiempos de hidrólisis podría estar relacionada con las distintas secuencias peptídicas liberadas en cada caso. La secuencia aminoacídica determina la habilidad de los péptidos para actuar como donadores de átomos de hidrógeno, y por tanto, de inhibir la cadena de reacciones oxidativas. Los hidrolizados que presentaron mayor actividad antioxidante fueron los obtenidos con Savinasa y Alcalasa a las 2 y 4 h de hidrólisis (S2 y A4), respectivamente. Estos resultados podrían atribuirse a la mayor eficiencia de estas enzimas para producir péptidos de pequeño tamaño en comparación con las demás enzimas. El peso molecular de los péptidos generados parece ser un factor determinante de la actividad captadora de radicales peroxilo. Estudios recientes realizados en hidrolizados proteicos de judía carilla y judía convencional han demostrado que la capacidad para atrapar radicales libres aumenta al disminuir el peso molecular de los mismos (Segura Campos y col., 2010; Carrasco-Castilla y col., 2012). De hecho, los péptidos antioxidantes derivados de proteínas alimentarias identificados hasta el momento son secuencias cortas de 2 a 16 residuos de

aminoácidos (Sarmadi y Ismail, 2010). La mayor eficiencia de las subtilisinas empleadas en esta Tesis Doctoral (Alcalasa y Savinasa) para liberar péptidos con actividad para atrapar radicales peroxilo es consistente con su especificidad para hidrolizar aminoácidos hidrofóbicos, que se ha demostrado que actúan como donadores de protones (Elias y col., 2008; Power y col., 2013). Los hidrolizados S2 mostraron una actividad antioxidante superior a los A4, sugiriendo la liberación de secuencias más activas en el primer caso. La actividad antioxidante de estos hidrolizados se analizó también después de ultrafiltración por membrana de 3 kDa, encontrándose un aumento de la misma (2 veces más) en ambos casos. Estos hallazgos sugieren que secuencias peptídicas cortas serían las responsables de la actividad antioxidante observada en los hidrolizados, resultados en concordancia con los observados en estudios previos (Segura Campos y col., 2010; Carrasco-Castilla y col., 2012). La actividad antioxidante encontrada en ambos hidrolizados fue muy superior a la observada en hidrolizados obtenidos a partir de distintos cultivares de soja con Alcalasa (Darmawan y col., 2010). Además, los hidrolizados obtenidos con ambas subtilisinas exhibieron una actividad antioxidante similar a la observada en vegetales (espinaca, brócoli, coliflor, pimienta verde, remolacha y cebolla morada) considerados como importantes fuentes de compuestos con elevada actividad para atrapar radicales peroxilo (Ou y col., 2002).

Debido a que los hidrolizados proteicos S2 y A4 fueron los que presentaron mayores actividades inhibidora de la ECA y antioxidante, se seleccionaron con el fin de conocer su composición peptídica mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF). En particular, se analizaron los permeados de 3 kDa que, como se ha mencionado anteriormente, son muy probablemente los responsables de la actividad biológica observada en los hidrolizados proteicos de lenteja. La comparación de los espectros de masas obtenidos para ambos hidrolizados indicó diferencias en la composición peptídica entre ambos, sugiriendo la diferente especificidad de ambas subtilisinas. Debido a que el hidrolizado S2 fue el que presentó mayor actividad biológica, fue seleccionado con el fin de identificar las secuencias peptídicas responsables de dicha actividad biológica.

Para ello se analizó la fracción peptídica inferior a 3 kDa mediante HPLC en fase reversa acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). En este hidrolizado proteico se identificaron tentativamente péptidos bioactivos que contenían secuencias descritas en la base de datos BIOPEP como inhibidoras de la ECA y antioxidantes. Los péptidos identificados procedían de las proteínas de almacenamiento de la lenteja (convicilina, vicilina, albúmina y legumina), del alérgeno Len c1 y de la lectina, y poseían en el extremo C-terminal residuos como Ala, Val, Leu, Tyr, Phe y Trp. La presencia de estos aminoácidos en el extremo C-terminal cumple la regla propuesta por Cheung y col (1980) sobre los residuos aminoacídicos presentes en los sustratos e inhibidores de la ECA. Además, los péptidos identificados en el hidrolizado S2 se caracterizaron por la presencia de varios aminoácidos aromáticos como Ala, Pro, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr y Met que pueden actuar como donadores de protones (Elias y col., 2008). En particular, los aminoácidos Tyr y Trp han sido descritos como responsables de la actividad antioxidante de diversos péptidos determinada mediante el método ORAC (Elias y col., 2006; Hernández-Ledesma y col., 2011). Algunos de los péptidos contenidos en el hidrolizado S2 presentaban el aminoácido His que se ha relacionado con la actividad antioxidante de los péptidos bioactivos debido a que el anillo imidazol puede actuar como donador de átomos de hidrógeno y atrapador de radicales libres (Elias y col., 2008). Los péptidos identificados en el hidrolizado S2 demuestran sus propiedades multifuncionales, que podrían ser una importante contribución en las intervenciones dietéticas destinadas a la prevención y tratamiento de la hipertensión. La novedad de este estudio reside en la realización de una caracterización exhaustiva de la fracción peptídica contenida en hidrolizados de lenteja multifuncionales. Hasta el momento de la realización de este estudio sólo se habían identificado tres péptidos con actividad inhibidora de la ECA (KLRT, TLHGMV y VNLRM) producidos a partir de proteínas de lenteja mediante hidrólisis secuencial con pepsina y pancreatina (Akıllıoğlu y Karakaya, 2009), ninguno de los cuales ha sido identificado en el hidrolizado S2 de lenteja. Numerosos estudios *in vivo* en modelos animales de hipertensión y en pacientes hipertensos han puesto de manifiesto que la

administración oral de péptidos con actividad inhibidora de la ECA derivados de proteínas alimentarias o de alimentos que contienen estos péptidos causa una reducción de la hipertensión (Foltz y col., 2009). Este hecho demuestra que los péptidos con actividad inhibidora de la ECA resisten la digestión gastrointestinal y son absorbidos a nivel intestinal para llegar a la molécula diana. Por tanto, con el fin de garantizar la actividad *in vivo* de los péptidos bioactivos, es necesario demostrar su estabilidad durante el proceso digestivo. Con este propósito, la fracción inferior a 3 kDa del hidrolizado S2 se sometió a una digestión secuencial con pepsina y pancreatina para simular la digestión gastrointestinal. Se ha descrito que la biodisponibilidad de los péptidos está relacionada con su estructura. Así, péptidos de pequeño tamaño e hidrofóbicos generalmente son resistentes a la digestión gastrointestinal y, por tanto, suelen ser absorbidos (Martínez-Maqueda y col., 2012). Los hidrolizados obtenidos con Savinasa en esta Tesis contienen péptidos hidrofóbicos de bajo peso molecular, fenómeno que sugiere su potencial biodisponibilidad. Tras la digestión gastrointestinal simulada, se evaluaron las actividades inhibidora de la ECA y antioxidante del hidrolizado S2, observándose una disminución del valor de IC_{50} para la ECA y un aumento de la actividad antioxidante de 3 veces. Estos resultados sugieren que durante la digestión gastrointestinal simulada se liberaron nuevos péptidos con actividad biológica, hecho que indicaría la posible mejora de la funcionalidad de estos hidrolizados tras la digestión gastrointestinal *in vivo* (Publicación I).

En una segunda parte del trabajo, se identificaron los péptidos mayoritarios presentes en la fracción < 3 kDa de los hidrolizados proteicos de lenteja más activos (Publicación II). En dicha fracción se detectaron ocho péptidos DLAIPVNRPGQLQSF (péptido 1), LLSGTQNQPSFLSGF (péptido 2), NSLTLPIRLYL (péptido 3), TLEPNSVFLPVLLH (péptido 4), DLAIPVNNPGQLESF (péptido 5), RFQTIYNENGHIRLL (péptido 6), LVNEGKGNLELVGF (péptido 7) and EITPEKNPQLQDLDIFVN (péptido 8) correspondientes a diferentes fragmentos de globulinas 11S y 7S (Len c1.0101 y Len c1.0102, vicilina, convicilina y legumina), lo que explica la mayor abundancia de estos péptidos en la fracción < 3 kDa. La mayoría de estos

péptidos contenían Phe y Leu en la primera posición del extremo C-terminal (C₁). Estos resultados fueron coherentes con la preferencia de las subtilisinas por los residuos hidrofóbicos en la posición P1 del sitio de escisión (Gupta y col., 2002). Posteriormente, los péptidos se sintetizaron químicamente en fase sólida y se evaluaron sus actividades antioxidante e inhibidora de la ECA.

La actividad antioxidante de los péptidos derivados de proteínas de lenteja varió desde 0,004 a 1,43 μmol Trolox equivalentes/ μmol péptido. Los valores de ORAC de los péptidos derivados de proteínas de lenteja fueron comparables a los valores encontrados en la bibliografía para péptidos derivados de la globulina 11S de amaranto (0,06-6,07 μmol Trolox equivalentes/ μmol péptido) (Orsini Delgado y col., 2016), caseína (0,025-3,22 μmol Trolox equivalentes/ μmol péptido) (Contreras Mdel y col., 2010; Contreras y col., 2013) y ovotransferrina (0,43-15,47 μmol Trolox equivalentes/ μmol péptido) (Shen y col., 2010), aunque fueron inferiores a los de otros péptidos derivados de proteínas de origen animal como la β -lactoglobulina (4,45-7,67 μmol Trolox equivalentes/ μmol péptido) ricos en residuos de Tyr y Trp, ambos relacionados con una mayor actividad para atrapar radicales libres (Hernandez-Ledesma y col., 2007; Shen y col., 2010).

Estudios de relación estructura-actividad de péptidos con actividad antioxidante han concluido que los residuos de la región C-terminal de los péptidos derivados de proteínas alimentarias es más importante que los de la región N-terminal para la actividad antioxidante (Li y Li, 2013). Para identificar la región de la secuencia que más contribuye en la actividad antioxidante de los péptidos derivados de proteínas lenteja se sintetizó el heptapéptido de la región C-terminal. La deleción de la región N-terminal de los péptidos dió lugar a resultados diferentes observándose en algunos casos pérdida, aumento o mantenimiento de la actividad antioxidante. Los resultados indicaron que la región C-terminal de los péptidos 2, 3 y 6 es determinante para su actividad antioxidante, como se observó previamente utilizando modelos QSAR (Li y Li, 2013). Por el contrario, la deleción de la región N-terminal de los péptidos 1, 4 y 7 redujo su actividad antioxidante, lo que indica que al menos algún residuo en

esta región contribuye a su actividad antioxidante. Además, Li y Li (2003) encontraron que las propiedades estéricas, hidrofóbicas y electrónicas de los residuos de aminoácidos en las posiciones 1 (C_1), 3 (C_3) y 4 (C_4) del extremo C-terminal y la posición 1 (N_1) del extremo N-terminal de péptidos alimentarios son determinantes para la actividad antioxidante medida por el método ORAC en el siguiente orden de importancia $C_3 > C_4 > C_1 > N_1$ (Li y Li, 2013). De forma similar, otros estudios en péptidos derivados de proteínas de la leche y el huevo señalaron que la presencia de aminoácidos voluminosos e hidrofóbicos (Trp, Tyr, Ile, Leu, Met, Phe) en la posición C_3 está relacionada con una mayor actividad antioxidante (Hernández-Ledesma y col., 2005; Hernandez-Ledesma y col., 2007; Shen y col., 2010). Estos requerimientos estructurales se cumplieron parcialmente en la secuencia los péptidos derivados de las proteínas de lenteja que presentaron en su mayoría residuos voluminosos e hidrofóbicos en la región C-terminal, aunque no siempre en las posiciones C_3 y C_4 de forma similar a lo observado recientemente en péptidos derivados de proteínas de amaranto con alta actividad antioxidante (Orsini Delgado y col., 2016).

De entre todos los péptidos estudiados, el péptido 3 (NSLTLPILRYL) destacó por presentar una elevada actividad antioxidante (1,4 veces más alta que la del Trolox) seguida del péptido 4 (TLEPNSVFLPVLLH) y el péptido 8 (EITPEKNPQLQDLDFVN). La mayor actividad antioxidante del péptido 3 podría ser debida a la presencia de un residuo de Tyr en la región C-terminal. El grupo fenol de la Tyr podría actuar como donador de hidrógeno a los radicales libres, generándose un radical fenoxilo mucho más estable que el radical peroxilo (Davalos y col., 2004; Hernández-Ledesma y col., 2005) Además de la Tyr, otros aminoácidos también poseen actividad antioxidante medida por el método ORAC en el siguiente orden $\text{Trp} > \text{Tyr} > \text{Met} > \text{Cys} > \text{His} > \text{Phe}$ (Saito y col., 2003; Shen y col., 2010). Estos aminoácidos también actúan como donadores de hidrógeno neutralizando los radicales peroxilo, lo que explicaría en parte la mayor actividad antioxidante de los péptidos 3, 4 y 8 con respecto al resto de los péptidos.

En cuanto a la actividad inhibidora de la ECA, el péptido 3 seguido de los péptidos 2 y 4 fueron los más potentes ($IC_{50}=77-119 \mu M$). La potencia de estos péptidos fue superior a la encontrada en la bibliografía para dipéptidos derivados de proteínas de guisante (2,25-7,23 mM) y comparable a la de péptidos derivados de proteínas de judía (17,5-191,5 μM), champiñón (115-129 μM) o semillas de cáñamo (27-574 μM) (Lau y col., 2014; Aluko y col., 2015a; Luna-Vital y col., 2015a). La delección de la región N-terminal aumentó la potencia de todos los péptidos derivados de proteínas de lenteja, destacando los fragmentos que contenían los siete últimos residuos de los péptidos 1 (51,75 μM), 3 (14,99 μM) y 4 (25,66 μM). Estos resultados indicaron que los residuos del heptapéptido C-terminal contribuyen a la actividad inhibidora de la ECA en concordancia con lo observado previamente por otros autores (Wu y col., 2006; Sagardia y col., 2013; Zhou y col., 2013; Aluko y col., 2015a). La capacidad de estos péptidos para inhibir la actividad de la ECA es consistente con estudios anteriores donde se demuestra que la presencia de residuos de aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos o Pro en la región C-terminal contribuye a una mayor actividad inhibidora de la ECA (Wu y col., 2006). Gracias a modelos QSAR se han podido establecer relaciones entre las posiciones de ciertos aminoácidos en la región C-terminal de la secuencia y una fuerte inhibición de la ECA en péptidos largos de origen alimentario (Sagardia y col., 2013; Aluko y col., 2015a). Aunque existen claras diferencias entre los estudios, un requisito común que se describe en todos ellos es la presencia de cargas positivas y aminoácidos voluminosos hidrofóbicos o aromáticos en el tetrapéptido de la región C-terminal de la secuencia. Estos requisitos se cumplían en los péptidos 3 y 4 lo que explicaría su mayor actividad inhibidora de la ECA.

Para confirmar la estabilidad gastrointestinal de los péptidos derivados de proteínas de lenteja se realizó una digestión gastrointestinal *in vitro* simulando las condiciones fisiológicas. En general, la acción de las enzimas digestivas aumentó las actividades antioxidante e inhibidora de la ECA de los péptidos de lenteja. Estos resultados sugieren la liberación de fragmentos activos más pequeños que junto con los péptidos no digeridos podrían ejercer un efecto

sinérgico. Cabe destacar la alta actividad antioxidante e inhibidora de la ECA en los digeridos gastrointestinales de los péptidos 1, 2, 3 y 4 (9,7-14,3 μmol Trolox equivalentes/ μmol péptido; IC_{50} =11,4-21,2 μM) la cual fue notablemente superior en comparación con digeridos gastrointestinales de péptidos antioxidantes derivados de caseína (1,38-4,16 μmol Trolox equivalentes/ μmol péptido) y amaranto (0,06-6,1 μmol Trolox equivalentes/ μmol péptido) (Contreras y col., 2013; Orsini Delgado y col., 2016). En cuanto a la actividad inhibidora de la ECA, la potencia de los péptidos derivados de proteínas de lenteja fue comparable a la de potentes inhibidores de la ECA derivados de proteínas alimentarias (IC_{50} =10-50 μM) (Aluko y col., 2015c).

Con el objetivo de conocer los sitios de unión a la ECA de los péptidos derivados de lenteja más potentes (péptidos 1, 3 y 4) se llevaron a cabo estudios de docking molecular empleando el heptapéptido de la región C-terminal ya que esta región de la secuencia fue la más importante en la inhibición de la actividad enzimática. Los estudios de docking molecular revelaron que los heptapéptidos 1, 3 y 4 ocupaban la misma localización en el centro activo de la ECA que la angiotensina II o la bradiquinina, con una orientación similar en el extremo N-terminal y C-terminal y compartiendo residuos importantes para la interacción, principalmente con el subsitio S2'. Estos heptapéptidos mostraron más interacciones con la enzima en el extremo C-terminal que en el N-terminal. En concreto, se observaron varios enlaces de hidrógeno entre el grupo carboxilo terminal de los heptapéptidos 1, 3 y 4 y las cadenas laterales de dos residuos de la ECA, (Tyr520 y Lys521). Además, los heptapéptidos 3 y 5 también mostraron un enlace de hidrógeno con el grupo amino de la cadena lateral de la Gln281. Estos tres residuos de la enzima (Tyr520, Lys521 y Gln281) también están implicados en la unión de la angiotensina II y la bradiquinina (Masuyer y col., 2012). Por otro lado, es interesante resaltar que la región N-terminal de los heptapéptidos 3 y 4 estuvo implicada en la formación de enlaces de hidrógeno con la cadena lateral del Glu403, residuo también implicado en la unión con la bradiquinina, mientras que el heptapéptido 1 formó un enlace de hidrógeno con el Asp358, residuo

implicado en la interacción con la angiotensina II. Además, las uniones de los tres péptidos a la enzima se estabilizaron con varias interacciones hidrofóbicas.

El dominios C- y N-terminal de la enzima están implicados en procesos biológicos divergentes (Masuyer y col., 2012; Bernstein y col., 2013; Harrison y Acharya, 2014). El dominio C-terminal de la ECA hidroliza más eficientemente la angiotensina I que el dominio N-terminal, mientras que la angiotensina 1-7, el péptido β -amieloide 1-42 o el péptido AcSDKP son mejor hidrolizados por el dominio N-terminal. Por tanto, existe un gran interés recientemente en encontrar inhibidores selectivos para el dominio C-terminal de la ECA que permitan controlar de forma eficiente la presión sanguínea y, al mismo, tiempo permitir la actividad del dominio N-terminal. Se han descrito sólo unos pocos inhibidores selectivos para el dominio C-terminal. La selectividad de estos inhibidores ha sido relacionada por su interacción con residuos clave y característicos del dominio C-terminal (Harrison y Acharya, 2014). En concreto, el residuo Glu403 del dominio C-terminal de la ECA es sustituido por una Arg (Arg381) en el dominio N-terminal. Este residuo (Glu403) está implicado en la unión de los heptapéptidos 3 y 4 de la enzima, lo que podría sugerir cierta selectividad de estos péptidos por el dominio C-terminal con respecto al N-terminal.

5.2. Producción y caracterización de hidrolizados proteicos multifuncionales a partir de judía pinta mediante hidrólisis con proteasas de grado alimentario.

Diversos estudios han demostrado una asociación entre el consumo de leguminosas y la prevención de ECV (Rebello y col., 2014; Arnoldi y col., 2015). Los efectos beneficiosos para la salud de las leguminosas se atribuyen a la presencia de diversos compuestos bioactivos, como péptidos bioactivos con actividades inhibidora de la ECA, anti-inflamatoria y antioxidante, que se liberan durante la digestión gastrointestinal, y compuestos fenólicos con actividad antioxidante, anti-inflamatoria, antihipertensiva y anti-aterosclerótica (Del Rio y col., 2013). La judía (*Phaseolus vulgaris* L) es la segunda leguminosa en términos de importancia económica detrás de la soja y representa un tercio de

la producción mundial de leguminosas (FAOSTAT, 2013). En los últimos años, la judía ha recibido una gran atención debido a sus efectos beneficiosos relacionados con la prevención de factores de riesgo cardiometabólico y de diversas enfermedades crónicas (Hayat y col., 2014). Sin embargo, a pesar de sus efectos fisiológicos positivos, la judía no ha sido explotada a nivel industrial y su consumo está disminuyendo (Kohajdová y col., 2013). Un modo de potenciar el consumo y utilización de la judía sería mediante el diseño de nuevos alimentos saludables derivados de esta leguminosa.

En este contexto, nos planteamos como objetivo la producción de hidrolizados proteicos funcionales a partir de judía pinta mediante hidrólisis con dos proteasas de grado alimentario, con el doble objetivo de liberar péptidos bioactivos y compuestos fenólicos unidos a las proteínas, aspectos no estudiados hasta el momento. Este estudio se realizó en concentrados proteicos de judía pinta obtenidos mediante extracción alcalina. Hay que señalar que durante el proceso de obtención de concentrados proteicos a partir de leguminosas, algunos compuestos fenólicos solubles pueden extraerse también (Martínez-Villaluenga y col., 2009), al interaccionar no covalentemente con las proteínas de almacenamiento. Así mismo, durante la extracción alcalina de proteínas, la fibra soluble se extrae también (Boye y col., 2010) obteniéndose un concentrado proteico rico en compuestos fenólicos ligados. A pesar de ello, no existen estudios en la bibliografía encaminados a evaluar el efecto de la hidrólisis enzimática en la liberación de compuestos fenólicos y cómo este fenómeno afecta a la concentración de compuestos fenólicos y la bioactividad de los hidrolizados obtenidos. Por ello, en nuestro estudio se emplearon dos proteasas de grado alimentario, Savinasa y Alcalasa, por ser las enzimas que mostraron mayor eficiencia para la producción de hidrolizados funcionales a partir de lenteja (Publicación I). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio con lenteja, las hidrólisis enzimáticas de judía se realizaron durante 30, 60, 90 y 120 min.

En los hidrolizados de judía obtenidos se evaluó el perfil electroforético con el objeto de conocer la eficacia del proceso hidrolítico (Publicación III). El concentrado proteico de judía mostró bandas correspondientes a las

subunidades de la faseolina, fitohemaglutininas, α -amilasa e inhibidor de la α -amilasa. Estas proteínas fueron hidrolizadas a péptidos de menor peso molecular (< 15 kDa) durante los primeros 30 min de digestión con Alcalasa, observándose una hidrólisis total de las mismas tras 120 min de reacción. Así mismo, los péptidos de bajo peso molecular formados durante 30 min de hidrólisis fueron degradándose a fracciones peptídicas menores a medida que aumentaba el tiempo. La Savinasa, aunque mostró menor eficiencia proteolítica, también fue capaz de hidrolizar las proteínas de judía parcialmente, obteniéndose fragmentos proteicos con peso molecular inferior a 20 kDa a los 30 min de digestión. Tiempos superiores de hidrólisis no causaron cambios significativos en el perfil proteico de los hidrolizados. De hecho, las bandas correspondientes a las subunidades de la faseolina y fitohemaglutininas permanecieron sin degradarse durante los 120 min de hidrólisis. La menor eficiencia hidrolítica de la Savinasa sobre las proteínas de judía puede atribuirse a su diferente especificidad de sustrato con respecto a la Alcalasa. La susceptibilidad de la faseolina a la hidrólisis con Alcalasa ha sido previamente observada por otros autores (Boye y col., 2010; Oseguera-Toledo y col., 2011), si bien existe una clara variabilidad en la tasa proteolítica de la faseolina entre los diversos estudios. Esta variabilidad puede explicarse por las diversas concentraciones de enzima y sustrato empleadas, así como por la heterogeneidad de la faseolina entre diversos cultivares de judía (Montoya y col., 2008). En este sentido, existe una gran variación en las subunidades precursoras de la faseolina ($\alpha\beta$, $\alpha\beta\beta$ y $\beta\beta$ para las faseolinas tipo S, T e I, respectivamente), así como en la composición de carbohidratos y en el número de sitios de unión a fosfato y carbohidratos en la faseolina (Montoya y col., 2010).

En los hidrolizados de judía producidos se estudió también la concentración de péptidos con peso molecular < 3 kDa, que como se ha explicado anteriormente, son generalmente los responsables de la actividad biológica de los hidrolizados proteicos. La concentración de péptidos aumentó con el tiempo de hidrólisis, independientemente de la proteasa empleada, resultados en concordancia con el perfil electroforético observado en los hidrolizados. La mayor acumulación de

péptidos se obtuvo tras 120 min de hidrólisis con Alcalasa, de acuerdo con la mayor eficiencia proteolítica de esta enzima sobre las proteínas de judía observada durante el análisis electroforético. La efectividad de la Alcalasa para liberar péptidos de bajo peso molecular a partir de proteínas de otras leguminosas como garbanzo (Medina-Godoy y col., 2012), diversas variedades de judías común, lima y Jamapa (Torruco-Uco y col., 2009; Rui y col., 2012; Ariza-Ortega y col., 2014) y lenteja (Barbana y Boye, 2011) ha sido previamente descrita. La Savinasa, sin embargo, ha sido menos estudiada en la producción de péptidos bioactivos a partir de leguminosas.

Otro de los aspectos evaluados en los hidrolizados de judía fue la concentración de compuestos fenólicos totales y de flavonoides. La hidrólisis con ambas subtilisinas causó un incremento progresivo de la concentración de compuestos fenólicos en los hidrolizados, aumento que fue dependiente del tiempo. El mayor contenido de compuestos fenólicos totales se observó en los hidrolizados proteicos obtenidos con Alcalasa durante 120 min y con Savinasa durante 90 min de hidrólisis, no encontrándose diferencias significativas entre ambos. Sin embargo, la hidrólisis con Alcalasa no produjo cambios significativos en el contenido de flavonoides, mientras que la digestión con Savinasa durante 30 min causó un incremento significativo de la concentración de estos compuestos. Tiempos de hidrólisis mayores con Savinasa no provocaron cambios importantes en la concentración de flavonoides.

Una vez conocido el efecto de la hidrólisis con subtilisinas en la liberación de péptidos y compuestos fenólicos, nos propusimos estudiar la actividad biológica de los hidrolizados obtenidos. En primer lugar se estudió la actividad antioxidante a través de cuatro métodos basados en diferentes mecanismos antioxidantes: capacidad de atrapar radicales de oxígeno (ORAC), capacidad de atrapar el ión férrico (FRAP), capacidad de atrapar el catión 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-3-6-sulfonato) (ABTS) y voltimetría cíclica (VC). El método ORAC se basa en un mecanismo de transferencia de un átomo de hidrógeno (Zheng y col., 2012), FRAP y VC en la transferencia de electrones y el método ABTS se basa en ambos mecanismos (Craft y col., 2012). Los hidrolizados proteicos producidos con Alcalasa y Savinasa presentaron un incremento de su

actividad antioxidante, determinada por los métodos ORAC y ABTS, con respecto al concentrado proteico no hidrolizado. Los mayores valores de ORAC se observaron en los hidrolizados obtenidos a 120 min de hidrólisis para ambas enzimas, no observándose diferencias significativas entre ambos hidrolizados. La actividad antioxidante determinada por el método ABTS aumentó progresivamente con el tiempo en los hidrolizados de Alcalasa, alcanzándose el valor máximo a los 120 min, mientras que con Savinasa se alcanzó el valor máximo a 30 min, no observándose cambios con tiempos de hidrólisis superiores. Con respecto al método FRAP, el tratamiento enzimático causó una reducción de la habilidad de donar electrones en los hidrolizados, con la excepción de la hidrólisis con Alcalasa durante 60 minutos, que resultó en un ligero incremento. Por último, la capacidad antioxidante determinada por el método VC se incrementó tras la hidrólisis con ambas enzimas, si bien este aumento fue dependiente del tiempo de hidrólisis. Tiempos de proteólisis cortos (30 min) causaron la mayor actividad reductora de electrones en los hidrolizados obtenidos con Alcalasa, mientras que en los producidos con Savinasa fueron necesarios tiempos de hidrólisis más largos para aumentar esta actividad (90 y 120 min). El análisis de correlaciones demostró que existían correlaciones positivas entre la actividad antioxidante, determinada por los métodos ORAC, ABTS y VC, y el contenido total de compuestos fenólicos y péptidos en los hidrolizados obtenidos con ambas enzimas. Un estudio previo realizado en leguminosas ha puesto de manifiesto que la hidrólisis con Alcalasa produce la liberación de péptidos pequeños con potente actividad antioxidante (López-Barrios y col., 2014). Esta capacidad se ha atribuido a su amplia especificidad y a su afinidad por los aminoácidos hidrofóbicos (Gupta y col., 2002). Sin embargo, los valores de FRAP se correlacionaron negativamente con el contenido peptídico y de compuestos fenólicos en los hidrolizados de judía. Nuestros resultados están de acuerdo por los observados en hidrolizados de cáñamo, donde se observó que el aumento del poder reductor estaba relacionado con el contenido de péptidos de gran tamaño (Girgih y col., 2011). La disminución del estrés oxidativo a través de antioxidantes de la dieta se considera una estrategia prometedora en la prevención de ECV (Leopold,

2015). Los hidrolizados obtenidos con Alcalasa y Savinasa en la presente Tesis Doctoral podrían suponer una gran contribución en la consecución de este objetivo, debido a su elevada actividad antioxidante.

Se determinó, además, la actividad inhibidora de la ECA en la fracción < 3 kDa de los hidrolizados de judía producidos. Los concentrados proteicos de judía presentaron una débil actividad inhibidora de esta enzima. La hidrólisis con Alcalasa y Savinasa causó un incremento gradual de la actividad inhibidora de la ECA de los hidrolizados obtenidos, alcanzándose un máximo a los 60 y 90 min de hidrólisis con Alcalasa y Savinasa, respectivamente. Tiempos superiores de proteólisis no produjeron cambios en dicha actividad en el caso de Alcalasa, provocando un descenso de la misma en el caso de Savinasa. El aumento de la actividad inhibidora de la ECA con el tiempo de hidrólisis ha sido también observado en garbanzo y judía por otros autores (Medina-Godoy y col., 2012; Rui y col., 2012). Se determinó, posteriormente, el valor de IC₅₀ en los hidrolizados más activos (obtenidos con Alcalasa a 120 min y Savinasa a 90 min) no observándose diferencias entre ambos. Estos valores de IC₅₀ están en el rango de los observados para los hidrolizados obtenidos a partir de otras leguminosas (López-Barrios y col., 2014) así como de otras fuentes alimentarias (Hernández-Ledesma y col., 2011). Se encontraron correlaciones positivas entre la actividad inhibidora de la ECA y el contenido en péptidos y compuestos fenólicos en los hidrolizados obtenidos con ambas enzimas. Estos resultados sugieren que tanto los péptidos como los compuestos fenólicos producidos contribuyen a la actividad inhibidora de la ECA de los hidrolizados de judía. La inhibición de la ECA conduce a una vasodilatación por reducción de los niveles de angiotensina II, potente vasoconstrictor. Diversos ensayos clínicos han demostrado que los inhibidores de la ECA reducen la morbilidad y mortalidad en pacientes que han sufrido infarto de miocardio o fallo cardiaco (Guerrero y col., 2012). Por este motivo, el consumo diario de alimentos que contengan compuestos inhibidores de la ECA se puede considerar una estrategia útil en la prevención y control de ECV.

Otra de las actividades biológicas evaluadas en los hidrolizados de judía fue la actividad anti-inflamatoria. La inflamación constituye parte de los mecanismos

de defensa del organismo frente a estímulos externos que causan lesiones del mismo. Sin embargo, una respuesta inflamatoria excesiva o aberrante es una de las causas subyacentes a los mecanismos patofisiológicos de la hipertensión y la aterosclerosis (Montecucco y col., 2013). El control de la inflamación mediante la dieta constituye una estrategia importante para mantener la salud y bienestar. En el presente estudio se emplearon células de colon humano (CCD-18Co) tratadas con interleuquina 1β (IL- 1β) como modelo de inflamación para evaluar la capacidad de los hidrolizados de judía producidos con Savinasa y Alcalasa para atenuar la liberación de IL-6 inducida por IL- 1β . La IL- 1β es una citoquina pro-inflamatoria producida *in vivo* por macrófagos activados e induce la secreción de IL-6 por células tanto inmunes como no inmunes en respuesta a una infección o daño celular (Dinarello, 2009). El tratamiento de las células con los hidrolizados de judía a la concentración empleada (0,01 mg/mL) no afectó a la viabilidad de las células de colon. Los hidrolizados obtenidos con Alcalasa a 15, 30 y 120 min y con Savinasa a 60 y 90 min causaron una reducción estadísticamente significativa ($P < 0,05$) en la secreción de IL-6 por parte de las células colónicas estimuladas por IL- 1β . La reducción observada fue dependiente tanto del tipo de proteasa como del tiempo de hidrólisis empleados. Los hidrolizados obtenidos con Alcalasa a 120 min fueron los más potentes inhibiendo la respuesta inflamatoria en las células CCD-18Co, seguidos por los hidrolizados producidos con Alcalasa durante 15 min y por Savinasa durante 60 y 90 min. La actividad anti-inflamatoria de hidrolizados de judía de las variedades Pinto, Durango y Negro 8028 producidos con Alcalasa y pepsina-pancreatina ha sido también descrita en otros modelos de inflamación como en macrófagos RAW267.4 activados por lipopolisacárido (Oseguera-Toledo y col., 2011). Estos autores han atribuido la actividad anti-inflamatoria de los hidrolizados de judía a su capacidad para inhibir la activación del factor de transcripción NF- $\kappa\beta$ y la síntesis de COX-2 y ONSi, enzimas implicadas en la síntesis de moléculas proinflamatorias.

Con el fin de conocer si las múltiples actividades biológicas observadas en los hidrolizados de judía se deben a la liberación de péptidos bioactivos y

compuestos fenólicos durante la hidrólisis enzimática, se realizó un análisis exhaustivo de las fracciones peptídica y fenólica de los hidrolizados más activos obtenidos (con Alcalasa y Savinasa durante 120 y 90 min, respectivamente).

Con respecto a la fracción peptídica, los péptidos más abundantes identificados fueron fragmentos del precursor de la faseolina tipo α , de la faseolina y de la faseolina tipo β . Los péptidos derivados de esta última proteína se identificaron sólo en los hidrolizados obtenidos con Savinasa. Estos resultados, junto con la identificación de secuencias de aminoácidos únicas en cada uno de los hidrolizados, confirmaron la diferente especificidad de las enzimas Alcalasa y Savinasa por las proteínas de judía. Empleando la base de datos BIOPEP y datos de la bibliografía, encontramos que los péptidos identificados contenían secuencias previamente descritas por tener una o varias actividades biológicas: antioxidante, inhibidora de la ECA o anti-inflamatoria. Hay que señalar, además, que la mayoría de los péptidos identificados presentaban en los tres últimos aminoácidos del extremo C-terminal características estructurales necesarias para bloquear el centro activo de la ECA. Estas características incluyen residuos hidrofóbicos voluminosos, cadenas laterales aromáticas o ramificadas, presencia de Pro en una o más posiciones, residuos de Arg y Lys positivamente cargados en posición 2 y residuos de Tyr, Phe o Trp en posición C₃ (Norris y col., 2013). Algunos de los péptidos identificados, además, presentaron características moleculares anteriormente descritas para péptidos con actividad antioxidante, como la presencia de Val en el extremo N-terminal o de Pro e His a lo largo de su secuencia (Samaranayaka y Li-Chan, 2011)

Posteriormente, se realizó una cuantificación de los compuestos fenólicos individuales para conocer el perfil fenólico en los hidrolizados obtenidos. Antes de la hidrólisis, los concentrados proteicos de judía mostraron compuestos hidroxicinámicos, presentes como ácidos libres, siendo el ácido ferúlico el compuesto mayoritario, si bien se detectaron también ácido sinápico y *p*-cumárico en menor concentración. Los flavan-3-oles constituyeron el principal grupo de compuestos fenólicos en los concentrados proteicos de judía. La

catequina fue el principal flavanol identificado, seguido de la epicatequina. Los flavonoles, sin embargo, fueron la familia de compuestos fenólicos menos abundante en los concentrados proteicos. En este grupo, los glucósidos de quercetina fueron los compuestos encontrados en mayor concentración, aunque se detectaron en menores niveles quercetina aglicona, así como glucósidos de la isoramnetina, miricetina y kanferol. Los concentrados proteicos de judía presentaron, además, antocianinas siendo los glucósidos de pelargonidina los más abundantes. La cianidina aglicona así como glucósidos de malvidina se identificaron también como compuestos minoritarios. El estudio del perfil fenólico en los hidrolizados obtenidos con Alcalasa a 120 min puso de manifiesto que éste no fue significativamente diferente al del concentrado proteico de judía. En cambio, en los hidrolizados obtenidos con Savinasa a 90 min se observó una ligera disminución de epicatequina, quercetina, 3-malonilglucósido y pelargonidina 3-malonilglucósido, aumentando pronunciadamente los niveles de catequina y pelargonidina. Así mismo, en estos hidrolizados se observaron incrementos menos importantes en el contenido de ácido ferúlico, quercetina 3-xylosiglucósido y malvidina 3-glucósido. Con el objeto de explicar la mayor eficiencia de la enzima Savinasa para incrementar el contenido de compuestos fenólicos en los hidrolizados de judía, se determinó la actividad esterasa de ambas enzimas. La Savinasa mostró una actividad esterasa 3 veces superior que la Alcalasa, resultados que coinciden con la mayor concentración de compuestos fenólicos en estos hidrolizados. La actividad esterasa de la Savinasa explicaría también el aumento de compuestos hidroxicinámicos en los hidrolizados de judía, ya que se ha descrito que las feruloilesterasas catalizan la de-esterificación de la fibra dietética, liberando hidroxicinamatos y compuestos derivados (Acosta-Estrada y col., 2014). Estas enzimas se han descrito en diferentes microorganismos, incluido *Bacillus spp.* (Donaghy y col., 1998), bacteria de la que proceden las enzimas Alcalasa y Savinasa empleadas en este estudio.

Los compuestos fenólicos identificados en ambos hidrolizados probablemente contribuyan también a la actividad biológica observada en ellos. Diversos estudios han puesto de manifiesto que los compuestos fenólicos pueden

contribuir al control de la hipertensión gracias a sus actividades antioxidante, inhibidora de la ECA y anti-inflamatoria. La actividad antioxidante de estos compuestos se ha atribuido, en parte, a su capacidad de quelar iones metálicos y neutralizar radicales libres por donación de protones o electrones (Rebello y col., 2014). Estudios de estructura-actividad han demostrado que los ácidos *p*-cumárico y ferúlico tienen una actividad antioxidante superior que otros derivados de los ácidos cinámico e hidroxibenzoico. Por otra parte, la catequina y la epicatequina son dos de los flavonoides con mayor potencia inhibidora de la ECA *in vitro* (Guerrero y col., 2012) Un estudio reciente ha mostrado que la quercetina, el kanferol y la miricetina presentaron una mayor modulación de la inflamación en cultivos de células endoteliales que los ácidos hidroxicinámicos como el *p*-cumárico, cafeico y caftárico (Calabriso y col., 2015). El ácido ferúlico, además, parece favorecer el aumento de la biodisponibilidad de ON mediante reducción de los niveles de TNF- α (Senaphan y col., 2015), contribuyendo muy probablemente a la actividad anti-inflamatoria observada en los hidrolizados de judía.

5.3. Producción y caracterización de hidrolizados proteicos multifuncionales a partir de lenteja castellana mediante hidrólisis enzimática asistida por APH.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que la digestión gastrointestinal o el procesado de las proteínas contenidas en los alimentos causa la liberación de péptidos biológicamente activos con actividades antihipertensiva, antioxidante, anti-inflamatoria e hipocolesterolémica y su consumo juega un papel importante en la mejora de la salud cardiovascular (Hernández-Ledesma y col., 2011). Por este motivo, existe un gran interés en la producción de hidrolizados funcionales que contengan péptidos bioactivos que puedan emplearse en la elaboración de alimentos funcionales. Los estudios encaminados a la producción de hidrolizados funcionales a partir de proteínas de lenteja son muy escasos, si bien se ha descrito la obtención de hidrolizados de lenteja con actividad inhibidora de la ECA (Barbana y Boye, 2011). Las APH aplicadas simultáneamente a la hidrólisis enzimática mejora la susceptibilidad de las proteínas a la digestión (Quirós y col., 2007), por lo que se presenta

como una alternativa valiosa en la producción de hidrolizados proteicos funcionales, que permitiría mejorar los rendimientos hidrolíticos, reduciendo los tiempos de reacción. Esta estrategia se ha empleado en la presente Memoria de Tesis para producir hidrolizados multifuncionales a partir de lenteja dirigidos al control de la hipertensión (Publicación IV). Para ello, se utilizaron 4 enzimas de grado alimentario (Alcalasa, Protamex, Savinasa y Corolasa 7089), y presiones de 100, 200, 300, 400 y 500 MPa, siendo el tiempo de hidrólisis de 15 min. Se realizaron, además, hidrólisis a presión atmosférica, que se consideraron los controles del estudio.

Uno de los factores críticos que tienen una influencia directa en el rendimiento hidrolítico es la solubilidad proteica, que puede verse afectada negativamente por la presión aplicada. Por este motivo, se determinó la concentración de proteína soluble en los concentrados proteicos de lenteja tratados por presiones entre 100 y 500 MPa. Los concentrados presurizados a 100-300 MPa mostraron un contenido de proteína soluble similar al concentrado no presurizado, si bien los tratamientos a 400 y 500 MPa causaron una reducción del contenido de proteína soluble. Esta disminución de la solubilidad proteica tras la presurización a 400 y 500 MPa ha sido previamente observado por otros autores en las globulinas 7S y 11S de altramuz, guisante, soja y garbanzo (Chapleau y de Lamballerie-Anton, 2003; Angiolini, 2013). Por el contrario, la solubilidad de las globulinas de judía roja presurizadas aumentó, siendo este incremento dependiente del nivel de presión aplicado (Yin y col., 2008). Las diferencias entre los diversos estudios pueden atribuirse a diferencias en el tipo de proteína y estabilidad conformacional de la leguminosa considerada. La reducción de la solubilidad proteica observada en los concentrados de lenteja presurizados podría deberse a la formación de agregados proteicos insolubles. La formación de agregados proteicos inducida por la presión se ha puesto de manifiesto también en aislados proteicos de judía, debido a la ruptura de interacciones hidrofóbicas en el interior de las vicilinas, que conduce a una exposición de grupos hidrofóbicos y de grupos sulfidrilo hacia la superficie proteica, produciendo una desnaturalización gradual de estas proteínas. Una vez finalizada la aplicación de la presión, los grupos hidrofóbicos y sulfidrilos

expuestos pueden formar nuevas interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro, causando la agregación de las vicilinas desnaturalizadas (Yin y col., 2008).

En base a estos resultados, para la producción de hidrolizados de lenteja funcionales se emplearon presiones comprendidas entre 100 y 300 MPa. El efecto de estos niveles de presión en el perfil proteico del concentrado proteico de lenteja se evaluó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS). Los resultados pusieron de manifiesto que la presurización no modificó el patrón electroforético del concentrado proteico. A diferencia de los hallazgos realizados en otras proteínas como β -lactoglobulina y ovoalbúmina (Chicón y col., 2006; Quirós y col., 2007; Chicón y col., 2008), la ausencia de nuevas bandas proteicas tras la presurización demostró que el tratamiento de APH de las proteínas de lenteja no causó una disociación de las subunidades de las globulinas o formación de oligómeros unidos por puentes disulfuro. La hidrólisis con las cuatro proteasas de grado alimentario empleadas causó cambios notables en el perfil electroforético de los concentrados proteicos, encontrándose que Alcalasa y Savinasa causaron una degradación significativa de las globulinas 7S y 11S, generando péptidos de peso molecular inferior a 10 kDa. La efectividad proteolítica de la Alcalasa sobre proteínas de leguminosas ha sido previamente observada en proteínas de soja (Peñas y col., 2006b). Sin embargo, Protamex y Corolasa 7089 causaron una hidrólisis menos efectiva de las proteínas de lenteja, dando lugar a la formación de polipéptidos con peso molecular comprendido entre 14 y 70 kDa. La hidrólisis con las cuatro enzimas dio lugar a un aumento significativo del contenido de péptidos < 3 kDa, siendo los hidrolizados obtenidos con Alcalasa los que presentaron el mayor contenido, seguidos de los producidos con Protamex, Corolasa 7089 y Savinasa. Cuando la hidrólisis se realizó asistida por APH, se observaron diferencias cualitativas en el perfil electroforético de los hidrolizados de lenteja, en comparación con los obtenidos a presión atmosférica, con la excepción de los producidos con Alcalasa. La hidrólisis con esta enzima durante el tratamiento de APH solamente causó un ligero incremento del contenido de péptidos de pequeño tamaño, en comparación con la hidrólisis a presión

atmosférica. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en un estudio previo que mostró que la actividad de la Alcalasa aumentó tras la presurización a 100-300 MPa (Zhang y col., 2012) Por el contrario, presiones de 200 MPa o superiores incrementaron considerablemente la susceptibilidad de las proteínas de lenteja a la hidrólisis con Protamex, Corolasa 7089 y Savinasa. Con estos niveles de presión, la hidrólisis de las globulinas 7S y 11S fue prácticamente completa. La hidrólisis enzimática a 300 MPa potenció considerablemente la intensidad de las bandas correspondientes a los fragmentos proteicos < 6 kDa y la concentración de péptidos < 3 kDa en comparación con niveles de presión menores. Nuestros resultados están en la misma línea que los obtenidos en estudios previos donde se demostró que la aplicación de APH potenció la proteólisis de soja (Peñas y col., 2006b), garbanzo (Zhang y col., 2012), judía (Yin y col., 2008), clara de huevo (Hoppe y col., 2013) y proteínas lácteas (Peñas y col., 2006d) por diferentes enzimas. El aumento de la susceptibilidad proteica a la hidrólisis durante el tratamiento de APH puede atribuirse a la exposición de nuevos enlaces peptídicos susceptibles de ser hidrolizados como consecuencia de la desnaturalización proteica y del aumento de la flexibilidad estructural inducidos por la presión (Belloque y col., 2007). Adicionalmente, las APH pueden incrementar la actividad enzimática y/o la interacción entre la enzima y el sustrato (Stapelfeldt y col., 1996). Modificaciones de la estructura tridimensional de la enzima inducidas por la presión también podrían afectar al centro activo, causando un aumento de la actividad o un cambio en la especificidad de sustrato (Claeys y col., 2003). Sin embargo, presiones superiores a 300 MPa pueden causar pérdida de actividad e, incluso, la inactivación completa de las enzimas, como ha sido previamente observado para la tripsina y la Alcalasa (Chicón y col., 2006; Yin y col., 2008; Zhang y col., 2012). En el caso de las enzimas sensibles a la presión, una estrategia alternativa para la producción de hidrolizados consiste en someter el sustrato proteico al tratamiento de APH previamente a la hidrólisis enzimática. En este contexto, se ha puesto de manifiesto que la presurización de las proteínas de suero lácteo antes de su hidrólisis con Corolasa 7089 incrementa el rendimiento de la proteólisis con respecto a la

aplicación de la presión simultáneamente a la digestión enzimática (Peñas y col., 2006a, 2006b, 2006c).

Otro de los objetivos de esta Memoria de Tesis fue la evaluación de las actividades biológicas de los hidrolizados de lenteja obtenidos en combinación con APH evaluándose, en primer lugar, la actividad inhibidora de la ECA. El concentrado proteico de lenteja mostró una actividad inhibidora de esta enzima muy débil, observándose que la presurización (100-300 MPa) no causó cambios significativos de la misma. Sin embargo, la hidrólisis a presión atmosférica con las cuatro enzimas empleadas incrementó notablemente la actividad inhibidora de la ECA, siendo los porcentajes de inhibición enzimática superiores tras la hidrólisis con Alcalasa y Savinasa, que con Protamex y Corolasa 7089. La aplicación de APH durante la digestión enzimática afectó de modo diferente a la actividad inhibidora de la ECA de los hidrolizados proteicos producidos. Así, la hidrólisis con Alcalasa bajo APH dio lugar a una reducción significativa de la actividad inhibidora de la ECA con respecto a la observada en el hidrolizado control obtenido a presión atmosférica, siendo mayor el descenso al aumentar la intensidad de la presión. A pesar de que la presurización aumentó el rendimiento proteolítico y la acumulación de péptidos < 3 kDa en los hidrolizados obtenidos con Alcalasa, no existió una relación directa entre este hecho y la actividad inhibidora de la ECA. Este resultado podría ser debido a la liberación bajo APH de secuencias aminoacídicas con menor actividad inhibidora de esta enzima. Por el contrario, la hidrólisis con el resto de enzimas durante la presurización (100-300 MPa) causó un aumento de la actividad inhibidora de la ECA en comparación a la observada en los respectivos hidrolizados control. La digestión con Protamex a 200 MPa originó hidrolizados de lenteja con mayor actividad inhibidora de la ECA que los obtenidos a 100 y 300 MPa. Sin embargo, al incrementar la presión aplicada, la actividad inhibidora de esta enzima aumentó en los hidrolizados obtenidos con Savinasa y Corolasa 7089, obteniéndose los máximos porcentajes de inhibición a 300 MPa. Estos resultados parecen indicar que el tratamiento de APH potenció la liberación de secuencias de aminoácidos bioactivas, probablemente debido a la mayor accesibilidad de las enzimas al sustrato y a la exposición de

nuevos enlaces susceptibles de ser hidrolizados. La especificidad de la proteasa y el grado de hidrólisis óptimo juegan, además, un papel importante en la liberación y acumulación de péptidos con actividad inhibidora de la ECA (Quirós y col., 2007). Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos en un estudio previo, que puso de manifiesto la producción de mayores cantidades de péptidos antihipertensivos tras la hidrólisis de ovoalbúmina durante 1 h a presiones en el rango 200-400 MPa en comparación con la hidrólisis durante 8 h a presión atmosférica (Quirós y col., 2007).

Con respecto a la actividad antioxidante de los hidrolizados de lenteja, no se apreciaron cambios tras la hidrólisis del concentrado proteico de lenteja a presión atmosférica con las cuatro enzimas empleadas. La combinación del proceso de hidrólisis enzimática y el tratamiento de APH a 100 MPa causó un incremento importante de los valores de ORAC de los hidrolizados, en comparación con los mostrados por los hidrolizados control. Sin embargo, la aplicación de presiones de 200 y 300 MPa durante la hidrólisis tuvo diferente influencia en la actividad antioxidante de los hidrolizados en función del tipo de proteasa usada. Así, los hidrolizados producidos con Alcalasa a 200 y 300 MPa presentaron menor actividad antioxidante que los obtenidos a 100 MPa, resultado similar al observado en los hidrolizados con Protamex a 300 MPa. Por el contrario, la hidrólisis con Savinasa a 200 y 300 MPa originó hidrolizados con mayor actividad antioxidante que los producidos a 100 MPa, siendo esta enzima la que dio lugar a los hidrolizados con mayor actividad antioxidante a estos niveles de presión. No se apreciaron, sin embargo, cambios en la actividad antioxidante de los hidrolizados producidos con Corolasa 7089 bajo presiones en el rango 100-300 MPa. Estos resultados son consistentes con los encontrados por Zhang y col., (2012) quienes observaron un aumento de la actividad para atrapar radicales libres en los hidrolizados de garbanzo obtenidos mediante hidrólisis con Alcalasa a 100-200 MPa durante 10 min, que se relacionó con el incremento del contenido de péptidos de bajo peso molecular. Sin embargo, la hidrólisis con Alcalasa a 300 MPa no mejoró la actividad de atrapar radicales libres del aislado proteico de garbanzo. En contraste con estudios previos (Carrasco-Castilla y col., 2012), en nuestro

estudio no observamos una relación directa entre la actividad antioxidante de los hidrolizados de lenteja y el contenido de péptidos de bajo peso molecular.

En base a su mayor contenido en péptidos < 3 kDa, así como a sus mayores actividades inhibidora de la ECA y antioxidante, los hidrolizados obtenidos con Savinasa a 300 MPa se seleccionaron para su caracterización posterior. La identificación de los péptidos liberados en el hidrolizado seleccionado se realizó en la fracción peptídica < 3 kDa mediante espectrometría de masas en tándem (MALDI TOF/TOF), y los resultados se compararon con los del hidrolizado control obtenido a presión atmosférica. El hidrolizado producido con Savinasa a 300 MPa presentó diferente patrón peptídico que el hidrolizado control, identificándose en el primero péptidos procedentes de las principales proteínas de almacenamiento de la lenteja (legumina, vicilina y convicilina) y de los alérgenos Len C 1.0101 y 1.0102, que no se observaron en los hidrolizados producidos a presión atmosférica. La diferencia en el perfil peptídico entre ambos hidrolizados puede atribuirse al diverso grado de hidrólisis alcanzado en cada uno de ellos. Las secuencias peptídicas identificadas se compararon con las contenidas en la base de datos BIOPEP, sugiriendo potenciales actividades inhibidora de la ECA y antioxidante en estos péptidos. Además, estos péptidos presentaron residuos de Ala, Val, Leu y Phe en el extremo C-terminal, todos ellos considerados residuos diana del centro catalítico de la ECA (Cheung y col., 1980). Con respecto a la relación estructura-actividad de los péptidos antioxidantes, diversos estudios han relacionado la actividad de atrapar radicales libres con la prevalencia de aminoácidos hidrofóbicos como Ala, Pro, Val, Ile, Leu, Phe, Trp y Tyr, que pueden actuar como donadores de protones (Elias y col., 2006; Contreras y col., 2011). Estos aminoácidos estuvieron presentes en los péptidos identificados en los hidrolizados producidos con Savinasa a 300 MPa. En particular, Tyr y Trp han sido identificados como los principales responsables de la actividad antioxidante de péptidos determinada por el método ORAC (Elias y col., 2008). En algunos de los péptidos identificados en el hidrolizado producido con Savinasa bajo APH también se encontraron residuos de His, aminoácido que ha sido asociado a la actividad antioxidante de los péptidos debido a la presencia de un anillo imidazol que

puede actuar como donador de protones o atrapar radicales libres (Elias y col., 2008). Así, la presencia de péptidos con residuos de His podría estar contribuyendo a la actividad antioxidante observada en los hidrolizados de lenteja producidos con Savinasa bajo APH. La identificación de secuencias con actividades inhibidora de la ECA y antioxidante sustenta las potenciales propiedades multifuncionales de los hidrolizados proteicos de lenteja producidos con Savinasa a 300 MPa.

Es ampliamente conocido que las enzimas gastrointestinales pueden producir una digestión de los péptidos bioactivos contenidos en las proteínas alimentarias afectando, por tanto, a su actividad biológica. Por este motivo, con el fin de conocer la influencia de la digestión gastrointestinal del hidrolizado producido con Savinasa a 300 MPa, la fracción peptídica < 3 kDa se sometió a una digestión secuencial con pepsina y pancreatina, simulando las condiciones de la digestión gastrointestinal. La digestión *in vitro* causó una ligera disminución de la actividad inhibidora de la ECA, que se hizo evidente por el aumento de los valores de IC_{50} para esta enzima en comparación con el hidrolizado control. Contrariamente, la digestión gastrointestinal simulada incrementó dos veces la actividad antioxidante de los hidrolizados con respecto a la observada en el control. Estos resultados sugieren la liberación de nuevos péptidos con actividad antioxidante durante la digestión gastrointestinal.

Los resultados obtenidos en esta sección de la presente Memoria de Tesis (Publicación VI) indican que las APH aplicadas simultáneamente a la hidrólisis enzimática es una herramienta eficaz en la obtención de hidrolizados proteicos de lenteja multifuncionales.

5.4. Producción y caracterización de hidrolizados proteicos multifuncionales a partir de judía pinta mediante hidrólisis enzimática asistida por APH.

La judía es una leguminosa de gran importancia económica a nivel mundial, de alto nivel nutritivo y con importantes beneficios para la salud (Olmedilla-Alonso y col., 2013; Borresen y col., 2014) Los efectos beneficiosos de esta leguminosa se deben parcialmente a su alto contenido y composición proteica,

que pueden dar lugar a la liberación de péptidos con actividades antioxidante, antihipertensiva, anticarcinogénica y anti-inflamatoria mediante hidrólisis enzimática (Luna-Vital y col., 2015b). Los compuestos fenólicos también son importantes compuestos bioactivos en la judía, que poseen actividades antioxidante, anti-inflamatoria, antihipertensiva y anti-aterosclerótica (Del Rio y col., 2013). La judía, por tanto, es una fuente económica de péptidos bioactivos, y la proteólisis constituye una alternativa novedosa para la explotación de esta leguminosa como producto nutracéutico o ingrediente funcional (Hayat y col., 2014). Sin embargo, la faseolina, principal proteína de almacenamiento en la judía, es muy resistente a la hidrólisis enzimática (Carbonaro y col., 2015) y, además, puede interactuar con los compuestos fenólicos presentes, provocando una disminución de la eficiencia hidrolítica o de la bioactividad de los hidrolizados (Flurkey y col., 2008; Tan y col., 2011; Hernández-Jabalera y col., 2015). El empleo de enzimas con actividades proteasa y esterasa, así como de estrategias tecnológicas que incrementen la eficiencia hidrolítica, son de gran interés para aumentar no sólo el rendimiento, sino también la funcionalidad de los hidrolizados de judía. Se ha descrito que las APH inducen la desnaturalización proteica y la ruptura de las interacciones entre proteínas y compuestos fenólicos, aumentando el rendimiento hidrolítico de ciertas enzimas (Barba y col., 2015). Por este motivo, en esta Memoria de Tesis se ha empleado la hidrólisis con Alcalasa y Savinasa, dos subtilisinas con actividades proteasa y esterasa, durante 15 min a 50 °C en combinación con APH (100-300 MPa), como estrategia tecnológica para la obtención de hidrolizados multifuncionales a partir de concentrados proteicos de judía (Publicación V).

En primer lugar, se evaluó el efecto de las APH en la solubilidad proteica de los concentrados de judía, observándose que presiones en el rango 100-300 MPa no causaron cambios significativos en esta propiedad. Estos resultados sugieren que este rango de presiones no induce la formación de agregados proteicos insolubles en la judía. Para descartar completamente esta posibilidad, se estudió el efecto de la aplicación de APH en el perfil electroforético del concentrado proteico. El concentrado proteico de judía no presurizado mostró

12 bandas principales con pesos moleculares comprendidos entre 10 y 95 kDa que se identificaron, teniendo en cuenta datos de la bibliografía, como linoleato 9S lipooxigenasa 1, legumina, faseolina, lectina, arcelina-4, fitohemaglutinina, inhibidor de tripsina, inhibidor de α -amilasa, inhibidor β de α -amilasa e inhibidor de proteasa Bowman-Birk (Rui y col., 2012; Mojica y de Mejia, 2015). La presurización a 100 y 200 MPa no causó cambios significativos en el perfil proteico de los concentrados de judía pinta, si bien presiones de 300 MPa dieron lugar a la desaparición de las bandas proteicas correspondientes a la linoleato 9S lipooxigenasa 1 y legumina, y redujo la intensidad de la correspondiente a las subunidades de la faseolina. Estos resultados sugieren la formación de agregados proteicos solubles, como ha sido observado previamente en proteínas de garbanzo y judía roja (Yin y col., 2008; Zhang y col., 2012). Se ha demostrado que presiones en el rango 200-600 MPa pueden mejorar la solubilidad de aislados proteicos de judía roja ricos en vicilina a través de la formación de agregados solubles (Yin y col., 2008). El tratamiento con APH induce la desnaturalización proteica gradual de las vicilinas en esta variedad de judía y la formación de puentes disulfuro entre grupos sulfidrilos libres, fenómeno que favorece la agregación proteica. Sin embargo, la agregación de las vicilinas causada por presiones superiores a 200 MPa tiene un impacto negativo en la hidrólisis *in vitro* de estas proteínas por la tripsina (Yin y col., 2008). Por este motivo, para la obtención de hidrolizados proteicos de judía pinta en esta Memoria de Tesis, se emplearon únicamente presiones de 100 y 200 MPa.

Un segundo aspecto estudiado fue el efecto de las APH sobre el patrón proteico de los hidrolizados producidos con Alcalasa y Savinasa mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS). La hidrólisis a presión atmosférica durante 15 min dio lugar a la degradación completa o reducción de las bandas proteicas con peso molecular en el rango 50-95 kDa, aunque la Alcalasa mostró mayor eficiencia proteolítica que la Savinasa, resultados que están de acuerdo con los obtenidos en los hidrolizados de lenteja (Publicación III, sección 5.3). Aunque la faseolina es muy resistente a los tratamientos enzimáticos debido a su estructura glicosilada y compacta (Mojica y de Mejia,

2015), la reducción de la intensidad de la banda electroforética correspondiente a esta proteína tras la hidrólisis con Alcalasa y Savinasa durante 15 min demuestra la efectividad de ambas subtilisinas para la producción de hidrolizados proteicos de judía. La hidrólisis combinada con el tratamiento APH causó un aumento del rendimiento hidrolítico y de la liberación de fragmentos proteicos con peso molecular < 15 kDa, en comparación con la llevada a cabo a presión atmosférica. Estos resultados coinciden con los encontrados en estudios previos, donde se observó que la aplicación de presiones moderadas (100-200 MPa) durante los tratamientos enzimáticos aceleró la hidrólisis de proteínas de guisante por las subtilisinas (Zhang y col., 2012; Chao y col., 2013). Esta mejora del rendimiento proteolítico también se observó en los hidrolizados obtenidos a partir de aislados proteicos de guisantes presurizados previamente a la hidrólisis enzimática (Chao y col., 2013). El aumento en la flexibilidad conformacional de las enzimas así como los cambios en los mecanismos de reacción inducidos por las APH parecen ser responsables del aumento de la tasa proteolítica en las hidrólisis asistidas por APH (Luong y Winter, 2015). Así mismo, el aumento de la susceptibilidad proteica a la hidrólisis durante los tratamientos de APH está relacionado con la desnaturalización proteica y la disociación de las subunidades de las proteínas oligoméricas que causan la exposición de nuevos enlaces peptídicos que son accesibles, de este modo, a las enzimas. En este sentido, Chao y col. (2013) demostraron que la presurización de aislados proteicos de guisante a 200 MPa a 24 °C durante 5 min incrementó un 15 % la exposición de residuos hidrofóbicos. El efecto de las APH en la conformación proteica está asociado a la desestabilización de interacciones no covalentes. Las interacciones hidrofóbicas, que juegan un papel importante en la estabilización de la estructura terciaria y en las interacciones proteína-proteína, son las más sensibles a la presión, seguidas de los enlaces iónicos y puentes de hidrógeno. Además, la incorporación de moléculas de agua al interior de la matriz proteica también tienen un papel fundamental en el proceso de desnaturalización proteica que tiene lugar durante la presurización (Rivalain y col., 2010).

Con el fin de estudiar la efectividad del tratamiento hidrolítico en la liberación de péptidos de pequeño tamaño durante la hidrólisis de proteínas de judía pinta, se determinó el contenido de péptidos < 3 kDa en el permeado obtenido tras ultrafiltración de los hidrolizados por membrana de este tamaño de poro. La presurización aumentó significativamente el contenido en péptidos en los concentrados proteicos de judía no hidrolizados, resultados también observados en los concentrados proteicos de lenteja, como hemos mencionado anteriormente (Publicación III, sección 5.3). La hidrólisis con Alcalasa y Savinasa a presión atmosférica provocó un aumento mucho mayor de la concentración de péptidos < 3 kDa, fenómeno también observado en los hidrolizados de lenteja, como se ha comentado en la sección 5.3. El contenido de péptidos de pequeño tamaño fue muy superior cuando la hidrólisis se realizó bajo presurización, resultados muy similares a los obtenidos en estudios previos que muestran mayor rendimiento en péptidos de bajo peso molecular en hidrolizados de judía común (Yin y col., 2008) y garbanzo (Zhang y col., 2012) obtenidos mediante hidrólisis enzimática asistida por APH en el rango 100-300 MPa.

En los hidrolizados obtenidos con Savinasa, cabe señalar que el contenido de péptidos < 3 kDa fue superior cuanto mayor fue la presión aplicada. En cambio, los hidrolizados producidos con Alcalasa a 200 MPa mostraron un menor contenido en péptidos que los obtenidos a 100 MPa. Un estudio reciente ha puesto de manifiesto que el nivel de presión aplicada causa diferencias en la distribución de los pesos moleculares de los péptidos producidos con Alcalasa. De este modo, presiones de 400 y 600 MPa aplicadas simultáneamente a la hidrólisis con esta proteasa originaron hidrolizados de guisante con un contenido en péptidos de alto peso molecular superior a los producidos a 200 MPa (Chao y col., 2013). Las diferencias observadas en el contenido de péptidos < 3 kDa entre los hidrolizados de judía pinta producidos con Alcalasa y Savinasa podría atribuirse a diferencias en la especificidad de cada una de ellas, así como a la magnitud del incremento de la actividad catalítica de cada una de las enzimas como consecuencia de la presión aplicada. Los hidrolizados obtenidos con Savinasa a 200 MPa fueron los que presentaron

mayor contenido de péptidos de bajo peso molecular, que fue superior al observado tras la hidrólisis de concentrados de judía a presión atmosférica durante 90 min (Publicación III, sección 5.2). Estos resultados sugieren que la hidrólisis enzimática asistida por APH es una estrategia eficiente en la producción de hidrolizados de judía pinta con alto contenido en péptidos de bajo peso molecular.

Otro de los objetivos de esta parte de la Tesis fue evaluar el contenido de compuestos fenólicos en los hidrolizados producidos. La digestión con Alcalasa y Savinasa a presión atmosférica produjo hidrolizados con un contenido de compuestos fenólicos superior que el concentrado proteico de judía, hecho que puede deberse a la liberación de compuestos fenólicos unidos a las proteínas como consecuencia de la hidrólisis proteica (Acosta-Estrada y col., 2014). Sin embargo, el contenido en flavonoides totales no se vio afectado por la hidrólisis enzimática a presión atmosférica, por lo que el aumento del contenido de compuestos fenólicos totales se debe a la liberación de compuestos no flavonoideos inducida por la proteólisis. Este hallazgo está de acuerdo con un estudio reciente que demuestra que las enzimas hidrolizan enlaces químicos entre proteínas y compuestos fenólicos causando la liberación de estos últimos compuestos, especialmente ácidos fenólicos, que son unos de los principales constituyentes de la pared celular (Ti y col., 2015), fenómeno que explicaría el incremento de compuestos fenólicos en los hidrolizados de judía pinta. De hecho, la Savinasa fue la enzima más efectiva en el aumento de los compuestos fenólicos totales en los hidrolizados de judía, debido a su mayor actividad esterasa, como hemos comentado anteriormente (Publicación I, sección 5.1). Las enzimas con actividad esterasa son las responsables en la hidrólisis de ácidos fenólicos unidos mediante enlaces tipo éster a las proteínas (Pérez-Jiménez y Torres, 2011). Las APH favorecieron la liberación de compuestos fenólicos durante la hidrólisis enzimática, obteniéndose el mayor incremento de la concentración de estos compuestos tras la hidrólisis con ambas subtilisinas a 200 MPa. La hidrólisis con Alcalasa bajo APH no modificó el contenido de flavonoides totales, mientras que la hidrólisis con Savinasa a 100 y 200 MPa mejoró el contenido de estos compuestos en los hidrolizados de

judía. El mayor contenido en compuestos fenólicos y flavonoides totales se observó en los hidrolizados con Savinasa a 200 MPa. El efecto positivo de la proteólisis asistida por APH en el contenido de compuestos fenólicos totales puede atribuirse a la combinación de la ruptura de las interacciones entre las proteínas y los compuestos fenólicos inducida por la presión, así como al aumento de la actividad catalítica de las enzimas que causan la hidrólisis proteica y la liberación de compuestos fenólicos no extraíbles (como la actividad esterasa). Se ha demostrado que el rendimiento de polifenoles aumenta tras el tratamiento de diversas matrices alimentarias vegetales así como distintos subproductos por APH (Barba y col., 2015). La presurización parece causar la ruptura de las matrices alimentarias y la activación de enzimas endógenas capaces de hidrolizar nutrientes macromoleculares liberando compuestos fenólicos asociados a macromoléculas o encapsulados en las matrices alimentarias (Rodríguez-Roque y col., 2015).

Con respecto a la actividad inhibidora de la ECA, hay que señalar que los concentrados proteicos de judía mostraron una actividad muy débil. Sin embargo, la hidrólisis con Alcalasa y Savinasa a presión atmosférica causó un aumento significativo de la actividad inhibidora de la ECA de la fracción < 3 kDa. Los hidrolizados obtenidos con ambas enzimas a 100 y 200 MPa mostraron una actividad inhibidora de la ECA mucho más potente que los obtenidos a presión atmosférica. En el caso particular de los hidrolizados obtenidos con Savinasa, la actividad inhibidora de la ECA solo aumentó significativamente cuando la digestión se realizó a 200 MPa. Los mayores porcentajes de inhibición de esta enzima se observaron en las fracciones < 3 kDa correspondientes a los hidrolizados proteicos producidos con Alcalasa y Savinasa a 100 y 200 MPa, respectivamente. Los valores de IC_{50} para los hidrolizados producidos bajo APH están en el rango de los datos publicados en la literatura para hidrolizados de judía producidos con diferentes enzimas durante tiempos mayores de hidrólisis (Luna-Vital y col., 2015b). La actividad inhibidora de la ECA en hidrolizados de judía se correlacionó positivamente con el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales, hecho que

sugiere que los compuestos fenólicos contribuyen a la actividad inhibidora de la ECA de los hidrolizados de judía obtenidos.

Así mismo, se evaluó la actividad antioxidante de los hidrolizados de judía producidos bajo APH mediante cuatro métodos diversos: ORAC, ABTS y poder reductor de los hidrolizados determinado mediante método FRAP y VC. Los resultados obtenidos mediante el método ORAC indicaron que la hidrólisis a presión atmosférica con ambas subtilisinas no causó cambios en la actividad antioxidante con respecto al concentrado proteico de judía. Las APH aplicadas durante el proceso de hidrólisis tuvieron distinta influencia en función del tipo de enzima y de la presión empleada. Así, los hidrolizados producidos con Alcalasa a 100 MPa presentaron valores de ORAC similares a los hidrolizados obtenidos a presión atmosférica, mientras que presiones superiores (200 MPa) causaron una disminución de la actividad antioxidante. Por el contrario, los hidrolizados producidos con Savinasa bajo APH mostraron valores de ORAC superiores a los obtenidos a presión atmosférica, siendo superiores los valores cuanto mayor fue la presión aplicada. Estos resultados indican que hay diferencias en el patrón de hidrólisis bajo presurización en función del tipo de subtilisina usada. Las APH parecen inducir la exposición de enlaces peptídicos susceptibles de ser hidrolizados en las proteínas de judía, fenómeno que causaría la liberación de compuestos con capacidad donadora de protones. Comparando todos los tratamientos, la digestión con Savinasa a 200 MPa dio lugar a los hidrolizados con los mayores valores de ORAC. La capacidad antioxidante de este hidrolizado es superior a la observada para los hidrolizados de lenteja obtenidos a 200 MPa con Savinasa durante 15 min mostrados en la sección 5.3 (Publicación III), así como para los hidrolizados producidos a partir de judía Pinto, Durango y Negro 8025 con Alcalasa o pepsina-pancreatina a presión atmosférica durante 180 min (Oseguera-Toledo y col., 2011).

Con respecto a la actividad de atrapar radicales libres determinada por el método ABTS, se observó un aumento cuando la hidrólisis se realizó asistida por APH, independientemente del nivel de presión y de la enzima empleados. Así, los hidrolizados obtenidos a 100 MPa con ambas enzimas y aquellos

obtenidos a 200 MPa con Savinasa presentaron la actividad antioxidante más alta determinada por este método. Estos resultados sugieren que los cambios conformacionales de las proteínas causados por la presurización favorecieron la liberación enzimática de compuestos con capacidad de captar radicales ABTS a partir de las proteínas de judía. Los valores de actividad antioxidante determinadas por este método en los hidrolizados de judía obtenidos bajo APH son menores que los encontrados por otros autores en hidrolizados obtenidos a partir de diversas variedades de judía común (Valdez-Ortiz y col., 2012; Ariza-Ortega y col., 2014; Betancur-Ancona y col., 2014). Las diferencias observadas podrían atribuirse no sólo a las diversas variedades de judía empleadas, sino también al uso de diferentes proteasas y condiciones de reacción (temperatura, pH, tiempo, relación enzima/sustrato y nivel de presión).

La evaluación del poder reductor de los hidrolizados de judía mediante el método FRAP puso de manifiesto que no existieron diferencias entre los hidrolizados obtenidos a presión atmosférica o bajo APH. Así, parece evidente que la proteólisis asistida por APH no favoreció la liberación de compuestos con capacidad de reducir el ión férrico a ión ferroso. Estos resultados son similares a los observados para hidrolizados obtenidos con Alcalasa a partir de concentrados proteicos de guisante presurizados a 200, 400 y 600 MPa (Girgih y col., 2011). Además, los valores de FRAP encontrados en los hidrolizados de judía pinta obtenidos con combinación con APH son menores que los observados para los hidrolizados de esta variedad de judía obtenidos con Alcalasa y Savinasa a presión atmosférica durante un periodo de tiempo comprendido entre 30 y 120 min, resultados mostrados en la sección 5.2 (Publicación III). De manera similar, el método de VC confirmó que el poder reductor de los hidrolizados de judía no aumentó cuando la hidrólisis enzimática se realizó simultáneamente a la presurización, con la excepción de los hidrolizados producidos con Alcalasa a 100 MPa, que mostraron una mejora con respecto a los obtenidos a presión atmosférica.

El efecto positivo de la proteólisis asistida por APH en la actividad antioxidante de los hidrolizados de judía podría estar relacionado con la producción de

péptidos de bajo peso molecular, como se ha observado previamente en hidrolizados de garbanzo (Zhang y col., 2012), pero también con la liberación de compuestos fenólicos no extraíbles con capacidad donadora de átomos de hidrógeno. Esta hipótesis está apoyada por la correlación positiva encontrada entre la actividad antioxidante de los hidrolizados obtenidos con Alcalasa (determinada por el método ABTS y FRAP) y Savinasa (determinada por ORAC y FRAP) y el contenido total de compuestos fenólicos, flavonoides y péptidos < 3 kDa. Con el fin de confirmar esta hipótesis, se estudió el perfil peptídico y fenólico y de los hidrolizados obtenidos con Savinasa a 200 MPa, por ser los que presentaron mayor bioactividad.

La caracterización peptídica se realizó mediante LC-MS/MS en la fracción de péptidos < 3 kDa de los hidrolizados seleccionados. En estos hidrolizados se identificaron más de 20 péptidos derivados de la faseolina. La actividad biológica potencial de estos péptidos se determinó mediante análisis *in silico* usando la base de datos BIOPEP (Minkiewicz, 2008). En la estructura primaria de estos hidrolizados se encontraron diversas secuencias de aminoácidos con actividades inhibidora de la ECA y antioxidante. Además, los péptidos identificados en estos hidrolizados presentaron características estructurales en la región C-terminal encontradas en otros péptidos con actividad inhibidora de la ECA (Norris y col., 2013). Entre estas características podemos destacar la presencia de Pro, de residuos hidrofóbicos voluminosos, de cadenas laterales aromáticas o ramificadas en posición 1 o en más posiciones, de aminoácidos cargados positivamente (Arg y Lys) en posición 2 y de aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr y Phe) en posición 3. Por otro lado, la presencia de aminoácidos básicos (His y Arg) y aromáticos (Trp, Tyr y Phe) en la secuencia de los péptidos identificados podría contribuir a su actividad antioxidante, ya que los grupos fenólicos, índoles e imidazoles presentes en los residuos de estos aminoácidos actúan como donadores de protones (Sarmadi y Ismail, 2010). La posición específica de los aminoácidos en la secuencia peptídica también puede contribuir en su actividad. Se ha demostrado que los péptidos antioxidantes contienen aminoácidos hidrofóbicos como Val, Leu, Ile y Ala en los extremos N- y C- terminal y aminoácidos polares/cargados (His y Arg) en el

extremo C-terminal (Li y Li, 2013). Además, los aminoácidos His, Asp y Glu pueden unir metales por la presencia de un anillo imidazol o de residuos cargados siendo, por ello, importantes en la inhibición de procesos de oxidación mediados por metales y en las propiedades quelantes de iones de los péptidos en los que están presentes (Torres-Fuentes y col., 2014). Por tanto, la presencia de estos aminoácidos en las secuencias peptídicas identificadas en los hidrolizados de judía podrían contribuir a su actividad antioxidante.

Con respecto a la caracterización del perfil fenólico, tanto en el concentrado proteico de judía como en los hidrolizados producidos con Savinasa a 200 MPa se identificaron más de 20 compuestos fenólicos distintos, que han sido también identificados en extractos obtenidos a partir de 24 variedades diferentes de judía común (Lin y col., 2008). En general, el contenido de los compuestos identificados fue mayor en los hidrolizados analizados que en el concentrado proteico. De este modo, el contenido de flavonoides totales fue dos veces superior en los hidrolizados que en el concentrado proteico. La proteólisis asistida por APH también incrementó 4 veces el contenido de catequina, que fue el compuesto fenólico más abundante en los hidrolizados de judía obtenidos con Savinasa a 200 MPa, si bien disminuyó el contenido de epicatequina en un 50%. El contenido de flavonoles también fue superior en los hidrolizados analizados que en el concentrado proteico. El análisis de los flavonoles individuales demostró que la quercetina-3-glucósido fue el compuesto mayoritario de este grupo en los hidrolizados de judía obtenidos bajo APH. Otros compuestos minoritarios, como la quercetina aglicona y los glucósidos de quercetina, isoramnetina, miricetina y de kanferol estuvieron también presentes en mayor concentración en los hidrolizados obtenidos a 200 MPa. El contenido de antocianinas totales fue 4 veces superior en los hidrolizados que en el concentrado proteico, siendo la pelargonidina-3-glucósido la antocianina más abundante. En lo que respecta a los ácidos hidroxicinámicos, su contenido aumentó en un 50% en los hidrolizados mencionados, en comparación con el concentrado proteico de judía, siendo el ácido ferúlico el compuesto mayoritario dentro de este grupo, mientras que los

ácidos *p*-cumárico y sinápico se detectaron en baja concentración. El aumento de la concentración de ácidos fenólicos y flavonoides en los hidrolizados seleccionados podría ser debido a la liberación de compuestos fenólicos unidos a la pared celular durante la hidrólisis enzimática asistida por APH. En este sentido, estudios previos han demostrado el aumento de la concentración de ácidos fenólicos, flavonoles y flavanoles en bebidas de frutas y de soja tratadas por APH (Barba y col., 2015; Rodríguez-Roque y col., 2015). Así mismo, se ha observado un incremento significativo del contenido de agliconas y glucósidos de antocianinas en subproductos derivados de uva presurizados en un rango de 200-600 MPa, a 20-70 °C durante 30-90 min (Corrales y col., 2008; Corrales y col., 2009). El efecto positivo de las APH en la concentración de compuestos fenólicos está relacionado con la ruptura de interacciones no covalentes proteína-proteína y proteína-polifenol, con la desnaturalización proteica y con el aumento de la actividad catalítica tanto esterasa como proteasa, que causarían la liberación de proantocianidinas no extraíbles que, posteriormente, se despolimerizarían debido al pH alcalino (Pérez-Jiménez, 2014).

Los compuestos fenólicos identificados en los hidrolizados de judía producidos con Savinasa a 200 MPa pueden ser parcialmente responsables de la bioactividad de estos hidrolizados. Los ácidos *p*-cumárico y ferúlico presentan actividades captadora de radicales libres, quelante de metales y secuestro del oxígeno singlete superiores que otros derivados de ácidos cinámicos e hidroxibenzoicos (Craft y col., 2012) mientras que la catequina y la epicatequina se encuentran entre los flavonoides que presentan mayor actividad inhibidora de la ECA *in vitro* (Guerrero y col., 2012).

Así, los resultados expuestos sugieren que la hidrólisis asistida por APH es una estrategia mucho más eficiente que la hidrólisis a presión atmosférica para producir hidrolizados proteicos multifuncionales con alto contenido en péptidos de bajo peso molecular y compuestos fenólicos a partir de judía pinta.

Conclusiones

6. Conclusiones

1. La hidrólisis de concentrados proteicos de judía y de lenteja con proteasas de grado alimentario es efectiva para producir hidrolizados proteicos multifuncionales, siendo el tipo de enzima y el tiempo de reacción factores cruciales en la actividad biológica de los hidrolizados producidos.
2. Las subtilisinas Alcalasa y Savinasa son las proteasas más efectivas para producir hidrolizados proteicos de lenteja con potentes actividades inhibidora de la ECA y antioxidante, destacando los hidrolizados obtenidos con Savinasa durante 120 min por ser los que presentaron mayores actividades biológicas.
3. Los principales péptidos responsables de las actividades antioxidante e inhibidora de la ECA de los hidrolizados de lenteja obtenidos con Savinasa durante 120 min fueron fragmentos de las proteínas vicilina, convicilina y legumina. La digestión gastrointestinal de estos péptidos aumentó su doble actividad biológica.
4. Los residuos de la región C-terminal con propiedades electrónicas, estéricas y/o hidrofóbicas fueron los mayormente implicados en la multiactividad de los péptidos derivados de proteínas de lenteja. Además, estos residuos estuvieron implicados en la formación de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas con residuos del centro catalítico de la ECA comunes a la unión de angiotensina I y bradiquinina.
5. La hidrólisis enzimática con Savinasa y Alcalasa durante 90 min y 120 min, respectivamente, dio lugar a hidrolizados proteicos de judía ricos en péptidos bioactivos y compuestos fenólicos con actividades inhibidora de la ECA, antioxidante y anti-inflamatoria. Los hidrolizados producidos con Savinasa presentaron una mayor concentración de compuestos fenólicos y los producidos con Alcalasa un mayor contenido de péptidos de bajo peso molecular (< 3 kDa) y mayor actividad anti-inflamatoria.
6. Las APH mejoraron la eficiencia proteolítica de las proteasas de grado alimentario estudiadas sobre las proteínas de lenteja y judía, así como

las actividades inhibidora de la ECA y antioxidante de los hidrolizados producidos con respecto a la hidrólisis a presión atmosférica.

7. La enzima Savinasa fue la más efectiva para producir hidrolizados multifuncionales a partir de proteínas de lenteja y judía en combinación con APH. Los hidrolizados proteicos con mayores actividades inhibidora de la ECA y antioxidante fueron obtenidos con esta enzima a 300 MPa en el caso de la lenteja y a 200 MPa en el caso de la judía.
8. Los hidrolizados proteicos de lenteja obtenidos con Savinasa a 300 MPa presentaron secuencias peptídicas derivadas de proteínas de almacenamiento y del alérgeno Len c1 responsables de las actividades inhibidora de la ECA y antioxidante observadas.
9. Los hidrolizados proteicos de judía obtenidos con Savinasa a 200 MPa exhibieron secuencias peptídicas con actividades inhibidora de la ECA y antioxidante, así como concentraciones elevadas de catequina, pelargonidina-3-glucósido y ácido ferúlico, responsables de las actividades biológicas observadas.

Bibliografía

7. Bibliografía

- Abete, I., Parra, D. and Martinez, J. A. 2009. Legume-, fish-, or high-protein-based hypocaloric diets: Effects on weight loss and mitochondrial oxidation in obese men. *Journal of Medicinal Food*, 12, 100-108.
- Abeysekara, S., Chilibeck, P. D., Vatanparast, H. and Zello, G. A. 2012. A pulse-based diet is effective for reducing total and LDL-cholesterol in older adults. *British Journal of Nutrition*, 108, S103-110.
- Academy of Nutrition and Dietetics 2014. Position and practice paper update for 2014. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 114, 297-298.
- Acosta-Estrada, B. A., Gutierrez-Uribe, J. A. and Serna-Saldivar, S. O. 2014. Bound phenolics in foods. Review. *Food Chemistry*, 152, 46-55.
- Aertsen, A., Meersman, F., Hendrickx, M. E. G., Vogel, R. F. and Michiels, C. W. 2009. Biotechnology under high pressure: Applications and implications. *Trends in Biotechnology*, 27, 434-441.
- Aiking, H. 2011. Future protein supply. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 112-120.
- Ajibola, C. F., Fashakin, J. B., Fagbemi, T. N. and Aluko, R. E. 2013. Renin and angiotensin converting enzyme inhibition with antioxidant properties of African yam bean protein hydrolysate and reverse-phase HPLC-separated peptide fractions. *Food Research International*, 52, 437-444.
- Åkesson, A., Larsson, S. C., Discacciati, A. and Wolk, A. 2014. Low-risk diet and lifestyle habits in the primary prevention of myocardial infarction in men a population-based prospective cohort study. *Journal of the American College of Cardiology*, 64, 1299-1306.
- Akillioğlu, H. G. and Karakaya, S. 2009. Effects of heat treatment and in vitro digestion on the Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of some legume species. *European Food Research and Technology*, 229, 915-921.
- Al Shukor, N., Van Camp, J., Gonzales, G. B., Staljanssens, D., Struijs, K., Zotti, M. J., Raes, K. and Smagghe, G. 2013. Angiotensin-converting enzyme inhibitory effects by plant phenolic compounds: A study of

- structure activity relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 11832-11839.
- Alam, M. A., Sernia, C. and Brown, L. 2013. Ferulic acid improves cardiovascular and kidney structure and function in hypertensive rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 61, 240-249.
- Altorf-Van Der Kuil, W., Engberink, M. F., Brink, E. J., Van Baak, M. A., Bakker, S. J., Navis, G., Van 'T Veer, P. and Geleijnse, J. M. 2010. Dietary protein and blood pressure: A systematic review. *PLoS One*, 5, e12102.
- Aluko, O. E., Beck, K. H. and Howard, D. E. 2015a. Medical students' beliefs about screening for intimate partner violence: A qualitative study. *Health Promotion Practice*, 16, 540-549.
- Aluko, R. E. 2015a. Antihypertensive peptides from food proteins. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6, 235-262.
- Aluko, R. E. 2015b. Structure and function of plant protein-derived antihypertensive peptides. *Current Opinion in Food Science*, 4, 44-50.
- Aluko, R. E., Girgih, A. T., He, R., Malomo, S., Li, H., Offengenden, M. and Wu, J. 2015b. Structural and functional characterization of yellow field pea seed (*Pisum sativum* L.) protein-derived antihypertensive peptides. *Food Research International*.
- Aluko, Y., Diehl, L., Jacoby, R., Chan, B., Andrews, S., Mcmillan, E., Sharkey, K., Shook, P., Ntim, W., Bolorunduro, O., Sossoman, L. B. and Rabb, C. 2015c. Simultaneous transcatheter aortic valve replacement and endovascular repair for critical aortic stenosis and large abdominal aortic aneurysm. *Cardiovascular Revascularization Medicine*, 16, 254-258.
- Alvarez, V., Quiroz, Y., Nava, M., Pons, H. and Rodríguez-Iturbe, B. 2002. Overload proteinuria is followed by salt-sensitive hypertension caused by renal infiltration of immune cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 283, F1132-F1141.
- Amarowicz, R. and Pegg, R. B. 2008. Legumes as a source of natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 865-878.

- Anderson, J. W. and Major, A. W. 2002. Pulses and lipaemia, short-and long-term effect: Potential in the prevention of cardiovascular disease. *British Journal of Nutrition*, 88, 263-271.
- Angiolini, A. C. 2013. Impact of high hydrostatic pressure on protein aggregation and rheological properties of legume batters. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 3576-3584.
- Araujo, M. and Wilcox, C. S. 2014. Oxidative stress in hypertension: Role of the kidney. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20, 74-101.
- Ariza-Ortega, T. D., Zenón-Briones, E., Castrejón-Flores, J., Yáñez-Fernández, J., Gómez-Gómez, Y. D. L. and Oliver-Salvador, M. D. 2014. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory, antimicrobial, and antioxidant effect of bioactive peptides obtained from different varieties of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) with in vivo antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats. *European Food Research and Technology*, 239, 785-794.
- Arnoldi, A., Zaroni, C., Lammi, C. and Boschini, G. 2015. The role of grain legumes in the prevention of hypercholesterolemia and hypertension. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34, 144-168.
- Azadbakht, L., Atabak, S. and Esmailzadeh, A. 2008. Soy protein intake, cardiorenal indices, and C-reactive protein in type 2 diabetes with nephropathy: a longitudinal randomized clinical trial. *Diabetes Care*, 31, 648-654.
- Bagatini, M. D., Martins, C. C., Battisti, V., Gasparetto, D., Da Rosa, C. S., Spanevello, R. M., Ahmed, M., Schmatz, R., Schetinger, M. R. C. and Morsch, V. M. 2011. Oxidative stress versus antioxidant defenses in patients with acute myocardial infarction. *Heart and Vessels*, 26, 55-63.
- Bakker, E. N. T. P., Matlung, H. L., Bonta, P., De Vries, C. J., Van Rooijen, N. and Vanbavel, E. 2008. Blood flow-dependent arterial remodelling is facilitated by inflammation but directed by vascular tone. *Cardiovascular Research*, 78, 341-348.
- Balny, C. and Masson, P. 1993. Effects of high pressure on proteins. *Food Reviews International*, 9, 611-628.

- Balti, R., Bougatef, A., Sila, A., Guillochon, D., Dhulster, P. and Nedjar-Arroume, N. 2015. Nine novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle protein hydrolysates and antihypertensive effect of the potent active peptide in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 170, 519-525.
- Banday, A. A. and Lokhandwala, M. F. 2008. Oxidative stress-induced renal angiotensin AT1 receptor upregulation causes increased stimulation of sodium transporters and hypertension. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 295, F698-706.
- Barba, F. J., Terefe, N. S., Buckow, R., Knorr, D. and Orlie, V. 2015. New opportunities and perspectives of high pressure treatment to improve health and safety attributes of foods. *Food Research International*, 77, 725-742.
- Barbana, C. and Boye, J. I. 2011. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. *Food Chemistry*, 127, 94-101.
- Beavers, K. M., Jonnalagadda, S. S. and Messina, M. J. 2009. Soy consumption, adhesion molecules, and pro-inflammatory cytokines: a brief review of the literature. *Nutrition Reviews*, 67, 213-221.
- Belski, R., Mori, T. A., Puddey, I. B., Sipsas, S., Woodman, R. J., Ackland, T. R., Beilin, L. J., Dove, E. R., Carlyon, N. B., Jayaseena, V. and Hodgson, J. M. 2011. Effects of lupin-enriched foods on body composition and cardiovascular disease risk factors: A 12-month randomized controlled weight loss trial. *International Journal of Obesity*, 35, 810-819.
- Belloque, J., Chicon, R. and Lopez-Fandino, R. 2007. Unfolding and refolding of beta-lactoglobulin subjected to high hydrostatic pressure at different pH values and temperatures and its influence on proteolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5282-5288.
- Bernstein, K. E., Ong, F. S., Blackwell, W. L., Shah, K. H., Giani, J. F., Gonzalez-Villalobos, R. A., Shen, X. Z., Fuchs, S. and Touyz, R. M. 2013. A modern understanding of the traditional and nontraditional

- biological functions of angiotensin-converting enzyme. *Pharmacological Reviews*, 65, 1-46.
- Betancur-Ancona, D., Sosa-Espinoza, T., Ruiz-Ruiz, J., Segura-Campos, M. and Chel-Guerrero, L. 2014. Enzymatic hydrolysis of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein concentrates and its effects on biological and functional properties. *International Journal of Food Science & Technology*, 49, 2-8.
- Bhat, Z. F., Kumar, S. and Bhat, H. F. 2015. Bioactive peptides of animal origin: Review. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 5377-5392.
- Boland, M. J., Rae, A. N., Vereijken, J. M., Meuwissen, M. P. M., Fischer, A. R. H., Van Boekel, M. a. J. S., Rutherfurd, S. M., Gruppen, H., Moughan, P. J. and Hendriks, W. H. 2013. The future supply of animal-derived protein for human consumption. *Trends in Food Science & Technology*, 29, 62-73.
- Bonomi, F., Fiocchi, A., Frokiaer, H., Gaiaschi, A., Iametti, S., Poiesi, C., Rasmussen, P., Restani, P. and Rovere, P. 2003. Reduction of immunoreactivity of bovine beta-lactoglobulin upon combined physical and proteolytic treatment. *Journal of Dairy Research*, 70, 51-59.
- Boonyaratanakornkit, B. B., Park, C. B. and Clark, D. S. 2002. Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1595, 235-249.
- Borresen, E. C., Gundlach, K. A., Wdowik, M., Rao, S., Brown, R. J. and Ryan, E. P. 2014. Feasibility of increased navy bean powder consumption for primary and secondary colorectal cancer prevention. *Current Nutrition & Food Science*, 10, 112-119.
- Boschin, G., Scigliuolo, G. M., Resta, D. and Arnoldi, A. 2014a. ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. *Food Chemistry*, 145, 34-40.
- Boschin, G., Scigliuolo, G. M., Resta, D. and Arnoldi, A. 2014b. Optimization of the enzymatic hydrolysis of Lupin (*Lupinus*) proteins for producing ACE-inhibitory peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 1846-1851.

- Bouchenak, M. and Lamri-Senhadji, M. 2013. Nutritional quality of legumes, and their role in cardiometabolic risk prevention. Review. *Journal of Medicinal Food*, 16, 185-198.
- Boudjou, S., Oomah, B. D., Zaidi, F. and Hosseinian, F. 2013. Phenolics content and antioxidant and anti-inflammatory activities of legume fractions. *Food Chemistry*, 138, 1543-1550.
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D. and Nasri, M. 2010. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry*, 118, 559-565.
- Boye, J., Zare, F. and Pletch, A. 2010. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43, 414-431.
- Brew, K. 2003. Structure of human ACE gives new insights into inhibitor binding and design. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24, 391-394.
- Broughton, W. J., Hern, X., Ndez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P. and Vanderleyden, J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) model food legumes. *Plant and Soil*, 252, 55-128.
- Brown, I. J., Tzoulaki, I., Candeias, V. and Elliott, P. 2009. Salt intakes around the world: Implications for public health. *International Journal of Epidemiology*. 38, 791-813.
- Burris, R. L., Ng, H. P. and Nagarajan, S. 2014. Soy protein inhibits inflammation-induced VCAM-1 and inflammatory cytokine induction by inhibiting the NF-kappaB and AKT signaling pathway in apolipoprotein E-deficient mice. *European Journal of Nutrition*, 53, 135-148.
- Calabriso, N., Scoditti, E., Massaro, M., Pellegrino, M., Storelli, C., Ingrosso, I., Giovinazzo, G. and Carluccio, M. A. 2015. Multiple anti-inflammatory and anti-atherosclerotic properties of red wine polyphenolic extracts: Differential role of hydroxycinnamic acids, flavonols and stilbenes on endothelial inflammatory gene expression. *European Journal of Nutrition*. Doi: 10.1007/s00394-015-0865-6.

- Campos-Vega, R., Guevara-Gonzalez, R., Guevara-Olvera, B., Oomah, B. D. and Loarca-Piña, G. 2010. Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) polysaccharides modulate gene expression in human colon cancer cells (HT-29). *Food Research International*, 43, 1057-1064.
- Carbonaro, M., Maselli, P. and Nucara, A. 2015. Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. *Food Research International*, 76, 19-30.
- Carey, R. M. and Padia, S. H. 2008. Angiotensin AT2 receptors: Control of renal sodium excretion and blood pressure. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 19, 84-87.
- Carrasco-Castilla, J., Hernandez-Alvarez, A. J., Jimenez-Martinez, C., Jacinto-Hernandez, C., Alaiz, M., Giron-Calle, J., Vioque, J. and Davila-Ortiz, G. 2012. Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 135, 1789-1795.
- Claeys, W. L., Van Loey, I. M. and Hendrickx, M. E. 2003. Review: Are intrinsic TTIs for thermally processed milk applicable for high-pressure processing assessment? *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4, 1-14.
- Clemente, A. 2000. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 254-262.
- Contreras M. D. M., Gomez-Sala, B., Martin-Alvarez, P. J., Amigo, L., Ramos, M. and Recio, I. 2010. Monitoring the large-scale production of the antihypertensive peptides RYLGY and AYFYPEL by HPLC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 2825-2832.
- Contreras, M. D. M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Martín-Álvarez, P. J. and Recio, I. 2011. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *Food Science and Technology*, 44, 9-15.
- Contreras, M. D. M., Sanchez, D., Sevilla, M. Á., Recio, I. and Amigo, L. 2013. Resistance of casein-derived bioactive peptides to simulated gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal*, 32, 71-78.

- Cooper, W. O., Hernandez-Diaz, S., Arbogast, P. G., Dudley, J. A., Dyer, S., Gideon, P. S., Hall, K. and Ray, W. A. 2006. Major congenital malformations after first-trimester exposure to ACE inhibitors. *New England Journal of Medicine*, 354, 2443-2451.
- Corrales, M., García, A. F., Butz, P. and Tauscher, B. 2009. Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering*, 90, 415-421.
- Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D. and Tauscher, B. 2008. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 85-91.
- Cotton, J., Hayashi, M. A., Cuniasse, P., Vazeux, G., Ianzer, D., De Camargo, A. C. and Dive, V. 2002. Selective inhibition of the C-domain of angiotensin I converting enzyme by bradykinin potentiating peptides. *Biochemistry*, 41, 6065-6071.
- Crackower, M. A., Sarao, R., Oudit, G. Y., Yagil, C., Kozieradzki, I., Scanga, S. E., Oliveira-Dos-Santos, A. J., Da Costa, J., Zhang, L., Pei, Y., Scholey, J., Ferrario, C. M., Manoukian, A. S., Chappell, M. C., Backx, P. H., Yagil, Y. and Penninger, J. M. 2002. Angiotensin-converting enzyme II is an essential regulator of heart function. *Nature*, 417, 822-828.
- Craft, B. D., Kerrihard, A. L., Amarowicz, R. and Pegg, R. B. 2012. Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 148-173.
- Crowley, S. D. 2014. The Cooperative roles of inflammation and oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Antioxidants and Redox Signaling*, 20, 102-120.
- Crowley, S. D. and Coffman, T. M. 2012. Recent advances involving the renin-angiotensin system. *Experimental Cell Research*, 318, 1049-1056.
- Chao, D., He, R., Jung, S. and Aluko, R. E. 2013. Effect of pressure or temperature pretreatment of isolated pea protein on properties of the enzymatic hydrolysates. *Food Research International*, 54, 1528-1534.

- Chapleau, N. and De Lamballerie-Anton, M. 2003. Improvement of emulsifying properties of lupin proteins by high pressure induced aggregation. *Food Hydrocolloids*, 17, 273-280.
- Chen, G. W., Tsai, J. S. and Sun Pan, B. 2007. Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation. *International Dairy Journal*, 17, 641-647.
- Chen, H.-M., Muramoto, K. and Yamauchi, F. 1995. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean beta-conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 574-578.
- Chen, H.-M., Muramoto, K., Yamauchi, F. and Nokihara, K. 1996. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2619-2623.
- Cheung, H. S., Wang, F. L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F. and Cushman, D. W. 1980. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 255, 401-407.
- Chicón, R., Belloque, J., Alonso, E. and López-Fandiño, R. 2008. Immunoreactivity and digestibility of high-pressure-treated whey proteins. *International Dairy Journal*, 18, 367-376.
- Chicón, R., López-Fandiño, R., Quirós, A. and Belloque, J. 2006. Changes in chymotrypsin hydrolysis of β -Lactoglobulin a induced by high hydrostatic pressure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2333-2341.
- Darmawan, R., Bringe, N. A. and De Mejia, E. G. 2010. Antioxidant capacity of alcalase hydrolysates and protein profiles of two conventional and seven low glycinin soybean cultivars. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 233-240.
- Davalos, A., Miguel, M., Bartolome, B. and Lopez-Fandino, R. 2004. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 67, 1939-1944.

- De Castro, R. J. S. and Sato, H. H. 2015. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International*, 74, 185-198.
- De Leo, F., Panarese, S., Gallerani, R. and Ceci, L. 2009. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides: production and implementation of functional food. *Current Pharmaceutical Design*, 15, 3622-3643.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G. and Crozier, A. 2013. Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants and Redox Signaling*, 18, 1818-1892.
- Dickson, M. E. and Sigmund, C. D. 2006. Genetic basis of hypertension: Revisiting angiotensinogen. *Hypertension*, 48, 14-20.
- Dinarello, C. A. 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology*, 27, 519-550.
- Dinh, Q. N., Drummond, G. R., Sobey, C. G. and Chrissobolis, S. 2014. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. *BioMed Research International*. Doi: 10.1155/2014/406960.
- Diplock, A. T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. B., and Roberfroid, M. B 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document. *British Journal of Nutrition*, 81, S1-27.
- Donaghy, J., Kelly, P. and McKay, A. 1998. Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus spp.* and lactobacilli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 257-260.
- Dong, X., Zhao, M., Shi, J., Yang, B., Li, J., Luo, D., Jiang, G. and Jiang, Y. 2011. Effects of combined high-pressure homogenization and enzymatic treatment on extraction yield, hydrolysis and function properties of peanut proteins. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12, 478-483.

- Drummond, G. R., Selemidis, S., Griendling, K. K. and Sobey, C. G. 2011. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10, 453-471.
- Dueñas, M., Hernández, T. and Estrella, I. 2007. Changes in the content of bioactive polyphenolic compounds of lentils by the action of exogenous enzymes. Effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 101, 90-97.
- Duranti, M. 2006. Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77, 67-82.
- Durazzo, A., Turfani, V., Azzini, E., Maiani, G. and Carcea, M. 2013. Phenols, lignans and antioxidant properties of legume and sweet chestnut flours. *Food Chemistry*, 140, 666-671.
- Ehlers, M. R., Fox, E. A., Strydom, D. J. and Riordan, J. F. 1989. Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 7741-7745.
- Elias, R. J., Bridgewater, J. D., Vachet, R. W., Waraho, T., McClements, D. J. and Decker, E. A. 2006. Antioxidant mechanisms of enzymatic hydrolysates of β -lactoglobulin in food lipid dispersions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9565-9572.
- Elias, R. J., Kellerby, S. S. and Decker, E. A. 2008. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 430-441.
- Erdmann, K., Cheung, B. W. Y. and Schröder, H. 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, 643-654.
- Fallah Noroozinejad, E., Hosseinpour Niazi, S., Mirmiran, P., Hedayati, M. and Delshad, H. 2015. Effect of legumes intake on the oxidative stress markers in type 2 diabetes patients: a randomized cross-over study. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 16, 319-328.
- Fan, J., Hu, X., Tan, S., Zhang, Y., Tatsumi, E. and Li, L. 2009. Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme-inhibitory

- peptide derived from douchi, a traditional Chinese fermented soybean food. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 603-608.
- Fang, Y. Z., Yang, S. and Wu, G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18, 872-879.
- Faostat 2013. Food and Agricultural Organization Statistics (FAOSTAT). . <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> (Accessed 12.12.15).
- FDA 1999. Food labeling: health claims; soy protein and coronary heart disease. Food and Drug Administration, HHS. Final rule. *Federal Register*, 64, 57700-57733.
- Fekete, Á., Givens, D. and Lovegrove, J. 2015. Casein-derived lactotripeptides reduce systolic and diastolic blood pressure in a meta-analysis of randomised clinical trials. *Nutrients*, 7, 659.
- Fiebig, R. G., Hollander, J. M., Ney, D., Boileau, R., Jeffery, E. and Ji, L. 2002. Training down-regulates fatty acid synthase and body fat in obese Zucker rats. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 34, 1106-1114.
- Fitzgerald, R. J. and Murray, B. A. 2006. Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 118-125.
- Flurkey, A., Cooksey, J., Reddy, A., Spoonmore, K., Rescigno, A., Inlow, J. and Flurkey, W. H. 2008. Enzyme, protein, carbohydrate, and phenolic contaminants in commercial tyrosinase preparations: potential problems affecting tyrosinase activity and inhibition studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4760-4768.
- Foltz, M., Van Buren, L., Klaffke, W. and Duchateau, G. S. 2009. Modeling of the relationship between dipeptide structure and dipeptide stability, permeability, and ACE inhibitory activity. *Journal of Food Science*, 74, H243-H251.
- Frokjaer, S. 1994. Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Technology*, 48, 86-88.
- Gao, X., Belmadani, S., Picchi, A., Xu, X., Potter, B. J., Tewari-Singh, N., Capobianco, S., Chilian, W. M. and Zhang, C. 2007. Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in Lepr (db) mice. *Circulation*, 115, 245-254.

- Ghribi, A. M., Sila, A., Przybylski, R., Nedjar-Arroume, N., Makhlouf, I., Blecker, C., Attia, H., Dhulster, P., Bougatef, A. and Besbes, S. 2015. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein concentrate. *Journal of Functional Foods*, 12, 516-525.
- Gibbs, B. F., Zougman, A., Masse, R. and Mulligan, C. 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research International*, 37, 123-131.
- Ginter, E. and Simko, V. 2015. Recent data on Mediterranean diet, cardiovascular disease, cancer, diabetes and life expectancy. *Bratislava Medical Journal*, 116, 346-348.
- Girgih, A. T., Udenigwe, C. C. and Aluko, R. E. 2011. In vitro antioxidant properties of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysate fractions. *Journal of The American Oil Chemists Society*, 88, 381-389.
- Giri, A., Osako, K., Okamoto, A., Okazaki, E. and Ohshima, T. 2011. Antioxidative properties of aqueous and aroma extracts of squid miso prepared with *Aspergillus oryzae*-inoculated koji. *Food Research International*, 44, 317-325.
- Gobbetti, M., Minervini, F. and Rizzello, C. G. 2004. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 173-188.
- Gravel, K., Lemieux, S., Asselin, G., Dufresne, A., Lemay, A., Forest, J.-C. and Dodin, S. 2010. Effects of pulse consumption in women presenting components of the metabolic syndrome: A randomized controlled trial. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3, 143-151.
- Grimble, G. K. 1994. The significance of peptides in clinical nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 14, 419-447.
- Groppelli, A., Giorgi, D. M., Omboni, S., Parati, G. and Mancia, G. 1992. Persistent blood pressure increase induced by heavy smoking. *Journal of Hypertension*, 10, 495-499.
- Guerrero, L., Castillo, J., Quinones, M., Garcia-Vallve, S., Arola, L., Pujadas, G. and Muguerza, B. 2012. Inhibition of angiotensin-converting enzyme

- activity by flavonoids: structure-activity relationship studies. *PLoS One*, 7, e49493.
- Gupta, R., Beg, Q. K. and Lorenz, P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 15-32.
- Gurley, S. B. and Coffman, T. M. 2008. Angiotensin-converting enzyme 2 gene targeting studies in mice: Mixed messages. *Experimental Physiology*, 93, 538-542.
- Ha, V., Sievenpiper, J. L., De Souza, R. J., Jayalath, V. H., Mirrahimi, A., Agarwal, A., Chiavaroli, L., Mejia, S. B., Sacks, F. M., Di Buono, M., Bernstein, A. M., Leiter, L. A., Kris-Etherton, P. M., Vuksan, V., Bazinet, R. P., Josse, R. G., Beyene, J., Kendall, C. W. and Jenkins, D. J. 2014. Effect of dietary pulse intake on established therapeutic lipid targets for cardiovascular risk reduction: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Canadian Medical Association Journal*, 186, E252-262.
- Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Roux, E., Perrin, C., Miclo, L. and Dary-Mourot, A. 2014. Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Research International*, 63, 71-80.
- Hall, J. E., Granger, J. P., Do Carmo, J. M., Da Silva, A. A., Dubinjon, J., George, E., Hamza, S., Speed, J. and Hall, M. E. 2012. Hypertension: physiology and pathophysiology. *Comprehensive Physiology*, 2, 2393-2442.
- Hamer, M. and Chida, Y. 2008. Active commuting and cardiovascular risk: a meta-analytic review. *Preventive Medicine*, 46, 9-13.
- Harrison, C. and Acharya, K. R. 2014. ACE for all - a molecular perspective. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 8, 195-210.
- Harrison, D. G., Guzik, T. J., Lob, H. E., Madhur, M. S., Marvar, P. J., Thabet, S. R., Vinh, A. and Weyand, C. M. 2011. Inflammation, immunity, and hypertension. *Hypertension*, 57, 132-140.

- Harvey, A., Montezano, A. C. and Touyz, R. M. 2015. Vascular biology of ageing-Implications in hypertension. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 83, 112-121.
- Hayat, I., Ahmad, A., Masud, T., Ahmed, A. and Bashir, S. 2014. Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): An overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 580-592.
- He, J., Gu, D., Wu, X., Chen, J., Duan, X., Chen, J. and Whelton, P. K. 2005. Effect of soybean protein on blood pressure: a randomized, controlled trial. *Annals of Internal Medicine*, 143, 1-9.
- He, R., Aluko, R. E. and Ju, X. R. 2014. Evaluating molecular mechanism of hypotensive peptides interactions with renin and angiotensin converting enzyme. *PLoS One*, 9, e91051.
- Hernsdorff, H. H., Zulet, M. A., Abete, I. and Martinez, J. A. 2011. A legume-based hypocaloric diet reduces proinflammatory status and improves metabolic features in overweight/obese subjects. *European Journal of Nutrition*, 50, 61-69.
- Hernandez-Alvarez, A. J., Carrasco-Castilla, J., Davila-Ortiz, G., Alaiz, M., Giron-Calle, J., Vioque-Pena, J., Jacinto-Hernandez, C. and Jimenez-Martinez, 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, 961-966.
- Hernández-Jabalera, A., Cortés-Giraldo, I., Dávila-Ortíz, G., Vioque, J., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Megías, C. and Jiménez-Martínez, C. 2015. Influence of peptides-phenolics interaction on the antioxidant profile of protein hydrolysates from *Brassica napus*. *Food Chemistry*, 178, 346-357.
- Hernandez-Ledesma, B., Amigo, L., Recio, I. and Bartolome, B. 2007. ACE-inhibitory and radical-scavenging activity of peptides derived from beta-lactoglobulin f(19-25). Interactions with ascorbic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3392-3397.

- Hernández-Ledesma, B., Del Mar Contreras, M. and Recio, I. 2011. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165, 23-35.
- Hernández-Ledesma, B., Miralles, B., Amigo, L., Ramos, M. and Recio, I. 2005. Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1041-1048.
- Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W. and Chi, L. 2008. The antihypertensive effect of peptides: a novel alternative to drugs? *Peptides*, 29, 1062-1071.
- Hoppe, A., Jung, S., Patnaik, A. and Zeece, M. G. 2013. Effect of high pressure treatment on egg white protein digestibility and peptide products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17, 54-62.
- Hosseinpour-Niazi, S., Mirmiran, P., Fallah-Ghohroudi, A. and Azizi, F. 2015. Non-soya legume-based therapeutic lifestyle change diet reduces inflammatory status in diabetic patients: a randomised cross-over clinical trial. *British Journal of Nutrition*, 114, 213-219.
- Huang, W. Y., Davidge, S. T. and Wu, J. 2013. Bioactive natural constituents from food sources-potential use in hypertension prevention and treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 615-630.
- Inoue, K., Gotou, T., Kitajima, H., Mizuno, S., Nakazawa, T. and Yamamoto, N. 2009. Release of antihypertensive peptides in miso paste during its fermentation, by the addition of casein. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108, 111-115.
- Iwaniak, A., Minkiewicz, P. and Darewicz, M. 2014. Food-originating ACE inhibitors, including antihypertensive peptides, as preventive food components in blood pressure reduction. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 114-134.
- Jackson, S. H., Devadas, S., Kwon, J., Pinto, L. A. and Williams, M. S. 2004. T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. *Nature Immunology*, 5, 818-827.
- Jakubczyk, A. and Baraniak, B. 2013. Activities and sequences of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides obtained from

- the digested lentil (*Lens culinaris*) globulins. *International Journal of Food Science & Technology*, 48, 2363-2369.
- Jayalath, V. H., De Souza, R. J., Sievenpiper, J. L., Ha, V., Chiavaroli, L., Mirrahimi, A., Di Buono, M., Bernstein, A. M., Leiter, L. A., Kris-Etherton, P. M., Vuksan, V., Beyene, J., Kendall, C. W. and Jenkins, D. J. 2014. Effect of dietary pulses on blood pressure: A systematic review and meta-analysis of controlled feeding trials. *American Journal of Hypertension*, 27, 56-64.
- Jenkins, D. J., Kendall, C. W., Augustin, L. S., Mitchell, S., Sahye-Pudaruth, S., Blanco Mejia, S., Chiavaroli, L., Mirrahimi, A., Ireland, C., Bashyam, B., Vidgen, E., De Souza, R. J., Sievenpiper, J. L., Coveney, J., Leiter, L. A. and Josse, R. G. 2012. Effect of legumes as part of a low glycemic index diet on glycemic control and cardiovascular risk factors in type 2 diabetes mellitus: A randomized controlled trial. *Archives of Internal Medicine*, 172, 1653-1660.
- Jenkins, D. J., Mirrahimi, A., Srichaikul, K., Berryman, C. E., Wang, L., Carleton, A., Abdounour, S., Sievenpiper, J. L., Kendall, C. W. and Kris-Etherton, P. M. 2010. Soy protein reduces serum cholesterol by both intrinsic and food displacement mechanisms. *Nutritional Journal*, 140, 2302s-2311s.
- Kim, N., Son, S. H., Maeng, J. S., Cho, Y. J. and Kim, C. T. 2015. Enzymatic hydrolysis of anchovy fine powder at high and ambient pressure, and characterization of the hydrolyzates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Doi: 10.1002/jsfa.7173.
- Kohajdová, Z., Karovičová, J. and Magala, M. 2013. Effect of lentil and bean flours on rheological and baking properties of wheat dough. *Chemical Papers*, 67, 398-407.
- Kokubo, Y. 2014. Prevention of hypertension and cardiovascular diseases: a comparison of lifestyle factors in westerners and east Asians. *Hypertension*, 63, 655-660.
- Korhonen, H. 2009. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1, 177-187.

Bibliografía

- Kou, X., Gao, J., Xue, Z., Zhang, Z., Wang, H. and Wang, X. 2013. Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. *LWT - Food Science and Technology*, 50, 591-598.
- Kunugi, S., Kitayaki, M., Yanagi, Y., Tanaka, N., Lange, R. and Balny, C. 1997. The effect of high pressure on thermolysin. *European Journal of Biochemistry*, 248, 567-574.
- Kwak, J. H., Kim, M., Lee, E., Lee, S. H., Ahn, C. W. and Lee, J. H. 2013. Effects of black soy peptide supplementation on blood pressure and oxidative stress: a randomized controlled trial. *Hypertension Research*, 36, 1060-1066.
- Lau, C. C., Abdullah, N., Shuib, A. S. and Aminudin, N. 2014. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from edible mushroom *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) imbach identified by LC-MS/MS. *Food Chemistry*, 148, 396-401.
- Lee, B. H., Lo, Y. H. and Pan, T. M. 2013. Anti-obesity activity of *Lactobacillus* fermented soy milk products. *Journal of Functional Foods*, 5, 905-913.
- Lee, Y. P., Mori, T. A., Puddey, I. B., Sipsas, S., Ackland, T. R., Beilin, L. J. and Hodgson, J. M. 2009. Effects of lupin kernel flour-enriched bread on blood pressure: a controlled intervention study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89, 766-772.
- Lemarie, C. A. and Schiffrin, E. L. 2010. The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 11, 19-31.
- Leopold, J. A. 2015. Antioxidants and coronary artery disease: from pathophysiology to preventive therapy. *Coronary Artery Disease*, 26, 176-183.
- Li, H. and Aluko, R. E. 2010. Identification and inhibitory properties of multifunctional peptides from pea protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11471-11476.
- Li, H., Prairie, N., Udenigwe, C. C., Adebisi, A. P., Tappia, P. S., Aukema, H. M., Jones, P. J. and Aluko, R. E. 2011a. Blood pressure lowering effect

- of a pea protein hydrolysate in hypertensive rats and humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 9854-9860.
- Li, H., Zhu, K., Zhou, H. and Peng, W. 2011b. Effects of high hydrostatic pressure on some functional and nutritional properties of soy protein isolate for infant formula. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 59, 12028-12036.
- Li, Y. W. and Li, B. 2013. Characterization of structure-antioxidant activity relationship of peptides in free radical systems using QSAR models: key sequence positions and their amino acid properties. *Journal of Theoretical Biology*, 318, 29-43.
- Lin, L.-Z., Harnly, J. M., Pastor-Corrales, M. S. and Luthria, D. L. 2008. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 107, 399-410.
- Liu, M., Bayjanov, J. R., Renckens, B., Nauta, A. and Siezen, R. J. 2010. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: A genomic comparison. *BMC Genomics*, 11, 36.
- López-Barrios, L., Gutiérrez-Urbe, J. A. and Serna-Saldívar, S. O. 2014. Bioactive peptides and hydrolysates from pulses and their potential use as functional ingredients. *Journal of Food Science*, 79, R273-R283.
- Lopez-Exposito, I., Chicon, R., Belloque, J., Recio, I., Alonso, E. and Lopez-Fandino, R. 2008. Changes in the ovalbumin proteolysis profile by high pressure and its effect on IgG and IgE binding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11809-11816.
- Luna-Vital, D. A., Gonzalez De Mejia, E., Mendoza, S. and Loarca-Pina, G. 2015a. Peptides present in the non-digestible fraction of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) inhibit the angiotensin-I converting enzyme by interacting with its catalytic cavity independent of their antioxidant capacity. *Food & Function*, 6, 1470-1479.
- Luna-Vital, D. A., Mojica, L., González De Mejía, E., Mendoza, S. and Loarca-Piña, G. 2015b. Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Review. *Food Research International*, 76, Part 1, 39-50.

- Luong, T. Q. and Winter, R. 2015. Combined pressure and cosolvent effects on enzyme activity. A high-pressure stopped-flow kinetic study on alpha-chymotrypsin. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17, 23273-23278.
- Majid, D. S., Prieto, M. C. and Navar, L. G. 2015. Salt-sensitive hypertension: perspectives on intrarenal mechanisms. *Current Hypertension Reviews*, 11, 38-48.
- Malaguti, M., Dinelli, G., Leoncini, E., Bregola, V., Bosi, S., Cicero, A. F. and Hrelia, S. 2014. Bioactive peptides in cereals and legumes: Agronomical, biochemical and clinical aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 21120-21135.
- Manzoni, C., Duranti, M., Eberini, I., Scharnag, H., Marz, W., Castiglioni, S. and Lovati, M. R. 2003. Subcellular localization of soybean 7S globulin in HepG2 cells and LDL receptor up-regulation by its alpha' constituent subunit. *Nutritional Journal*, 133, 2149-2155.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I. and Hernández-Ledesma, B. 2012. Antihypertensive peptides from food proteins. Review. *Food & Function*, 3, 350-361.
- Martinez-Villaluenga, C., Torino, M. I., Martín, V., Arroyo, R., Garcia-Mora, P., Estrella Pedrola, I., Vidal-Valverde, C., Rodriguez, J. M. and Frias, J. 2012. Multifunctional properties of soy milk fermented by enterococcus faecium strains isolated from raw soy milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10235-10244.
- Martínez-Villaluenga, C., Zieliński, H., Frias, J., Piskuła, M. K., Kozłowska, H. and Vidal-Valverde, C. 2009. Antioxidant capacity and polyphenolic content of high-protein lupin products. *Food Chemistry*, 112, 84-88.
- Masuyer, G., Schwager, S. L., Sturrock, E. D., Isaac, R. E. and Acharya, K. R. 2012. Molecular recognition and regulation of human angiotensin-I converting enzyme (ACE) activity by natural inhibitory peptides. *Scientific Reports*, 2, 717.
- McCarthy, A. L., O'callaghan, Y. C. and O'brien, N. M. 2013. Protein hydrolysates from agricultural crops-bioactivity and potential for functional food development. *Agriculture*, 3, 112-130.

- Medina-Godoy, S., Ambriz-Pérez, D. L., Fuentes-Gutiérrez, C. I., Germán-Báez, L. J., Gutiérrez-Dorado, R., Reyes-Moreno, C. and Valdez-Ortiz, A. 2012. Angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidative activities and functional characterization of protein hydrolysates of hard-to-cook chickpeas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 1974-1981.
- Minami, J., Ishimitsu, T. and Matsuoka, H. 1999. Is it time to regard cigarette smoking as a risk factor in the development of sustained hypertension? *American Journal of Hypertension*, 12, 948-949.
- Minkiewicz, P., Dziuba, J., Iwaniak, A., Dziuba, M., Darewicz, M. 2008. BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. *Journal of AOAC International*, 91, 965-980.
- Miraghajani, M. S., Esmailzadeh, A., Najafabadi, M. M., Mirlohi, M. and Azadbakht, L. 2012. Soy milk consumption, inflammation, coagulation, and oxidative stress among type 2 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes Care*, 35, 1981-1985.
- Mojica, L. and De Mejia, E. G. 2015. Characterization and comparison of protein and peptide profiles and their biological activities of improved common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mexico and Brazil. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70, 105-112.
- Montecucco, F., Mach, F. and Pende, A. 2013. Inflammation is a key pathophysiological feature of metabolic syndrome. *Mediators of Inflammation*. Doi: 10.1155/2013/135984.
- Montecucco, F., Pende, A., Quercioli, A. and Mach, F. 2011. Inflammation in the pathophysiology of essential hypertension. *Journal of Nephrology*, 24, 23-34.
- Montoya, C. A., Lallès, J.-P., Beebe, S. and Leterme, P. 2010. Phaseolin diversity as a possible strategy to improve the nutritional value of common beans (*Phaseolus vulgaris*). *Food Research International*, 43, 443-449.
- Montoya, C. A., Leterme, P., Victoria, N. F., Toro, O., Souffrant, W. B., Beebe, S. and Lallès, J. P. 2008. Susceptibility of phaseolin to in vitro proteolysis

- is highly variable across common bean varieties (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2183-2191.
- Najafian, L. and Babji, A. S. 2012. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. *Peptides*, 33, 178-185.
- Nakahara, T., Sano, A., Yamaguchi, H., Sugimoto, K., Chikata, H., Kinoshita, E. and Uchida, R. 2010. Antihypertensive effect of peptide-enriched soy sauce-like seasoning and identification of its angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 58, 821-827.
- Nasri, R., Amor, I. B., Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Dhulster, P., Gargouri, J., Châabouni, M. K. and Nasri, M. 2012. Anticoagulant activities of goby muscle protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 133, 835-841.
- Natesh, R., Schwager, S. L. U., Sturrock, E. D. and Acharya, K. R. 2003. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature*, 421, 551-554.
- Nejati, F., Rizzello, C. G., Di Cagno, R., Sheikh-Zeinoddin, M., Diviccaro, A., Minervini, F. and Gobbetti, M. 2013. Manufacture of a functional fermented milk enriched of Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE)-inhibitory peptides and γ -amino butyric acid (GABA). *LWT - Food Science and Technology*, 51, 183-189.
- Nesse, K. O., Nagalakshmi, A. P., Marimuthu, P., Singh, M., Bhetariya, P. J., Ho, M. and Simon, R. R. 2014. Safety evaluation of fish protein hydrolysate supplementation in malnourished children. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 69, 1-6.
- Nichols, M., Townsed, N., Luengo-Fernandez, R., Leal, J., Gray, A., Scarborough, P., Reyner, M. 2012. European cardiovascular disease statistics. *European Heart Network, Brussels, European of Society Cardiology, Sophia Antipolis*.
- Nilsson, A., Johansson, E., Ekstrom, L. and Bjorck, I. 2013. Effects of a brown beans evening meal on metabolic risk markers and appetite regulating

- hormones at a subsequent standardized breakfast: a randomized cross-over study. *PLoS One*, 8, e59985.
- Niva, M. 2007. 'All foods affect health': understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented finns. *Appetite*, 48, 384-393.
- Norris, R., Harnedy, P. A. and Fitzgerald, R. J. 2013. Antihypertensive peptides from marine sources. En: *Bioactive Compounds from Marine Foods*. B. Hernández-Ledesma and M. Herrero (Eds.). John Wiley & Sons Ltd, pp. 27-56.
- Nowicka, G., Klosiewicz-Latoszek, L., Sirtori, C., Arnoldi, A. and Naruszewicz, M. 2006. Th-W55: 4 Lupin proteins in the treatment of hypercholesterolemia. *Atherosclerosis Supplements*, 7, 477.
- Oey, I., Lille, M., Van Loey, A. and Hendrickx, M. 2008. Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit- and vegetable-based food products: Review. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 320-328.
- Olivieri, O., Lombardi, S., Russo, C., Girelli, D., Guarini, P., Carletto, A. and Corrocher, R. 1998. Neutrophil arachidonic acid level and adhesive capability are increased in essential hypertension. *Journal of Hypertension*, 16, 585-592.
- Olmedilla-Alonso, B., Pedrosa, M. M., Cuadrado, C., Brito, M., Asensio, S. M. C. and Asensio-Vegas, C. 2013. Composition of two Spanish common dry beans (*Phaseolus vulgaris*), 'Almonga' and 'Curruquilla', and their postprandial effect in type 2 diabetics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 1076-1082.
- Oparil, S., Zaman, M. A. and Calhoun, D. A. 2003. Pathogenesis of hypertension. *Annals of Internal Medicine*, 139, 761-776.
- Orsini Delgado, M. C., Nardo, A., Pavlovic, M., Rogniaux, H., Añón, M. C. and Tironi, V. A. 2016. Identification and characterization of antioxidant peptides obtained by gastrointestinal digestion of amaranth proteins. *Food Chemistry*, 197, 1160-1167.
- Oseguera-Toledo, M. E., De Mejia, E. G., Dia, V. P. and Amaya-Llano, S. L. 2011. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hydrolysates inhibit

- inflammation in LPS-induced macrophages through suppression of NF-kappaB pathways. *Food Chemistry*, 127, 1175-1185.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A. and Deemer, E. K. 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3122-3128.
- Pacurari, M., Kafoury, R., Tchounwou, P. B. and Ndebele, K. 2014. The Renin-Angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling. *International Journal of Inflammation*. Doi: 10.1155/2014/689360.
- Pauletto, P. and Rattazzi, M. 2006. Inflammation and hypertension: the search for a link. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21, 850-853.
- Pedersen, B. 1994. Removing bitterness from protein hydrolysates. *Food Technology*, 48, 96-98.
- Peñas, E., Préstamo, G. and Gomez, R. 2004. High pressure and the enzymatic hydrolysis of soybean whey proteins. *Food Chemistry*, 85, 641-648.
- Peñas, E., Préstamo, G., Luisa Baeza, M., Martínez-Molero, M. I. and Gomez, R. 2006a. Effects of combined high pressure and enzymatic treatments on the hydrolysis and immunoreactivity of dairy whey proteins. *International Dairy Journal*, 16, 831-839.
- Peñas, E., Préstamo, G., Polo, F. and Gomez, R. 2006b. Enzymatic proteolysis, under high pressure of soybean whey: Analysis of peptides and the allergen Gly m 1 in the hydrolysates. *Food Chemistry*, 99, 569-573.
- Peñas, E., Restani, P., Ballabio, C., Préstamo, G., Fiocchi, A. and Gómez, R. 2006c. Assessment of the residual immunoreactivity of soybean whey hydrolysates obtained by combined enzymatic proteolysis and high pressure. *European Food Research and Technology*, 222, 286-290.
- Peñas, E., Snel, H., Floris, R., Préstamo, G. and Gomez, R. 2006d. High pressure can reduce the antigenicity of bovine whey protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, 16, 969-975.

- Pérez-Jiménez, J., Díaz-Rubio, M. E., Saura-Calixto, F. 2014. Non-extractable polyphenols in plant foods: Nature, isolation and analysis. En: *Polyphenols in plants. Isolation, purification and extract preparation*. R. Watson (Eds). *Academic Press-Elsevier*, pp. 203-218.
- Pérez-Jiménez, J. and Torres, J. L. 2011. Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: The current state of the art. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12713-12724.
- Peters, J. 1995. Molecular basis of human hypertension: the role of angiotensin. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 9, 657-678.
- Pilvi, T. K., Jauhiainen, T., Cheng, Z. J., Mervaala, E. M., Vapaatalo, H. and Korpela, R. 2006. Lupin protein attenuates the development of hypertension and normalises the vascular function of NaCl-loaded Goto-Kakizaki rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 57, 167-176.
- Pittaway, J. K., Robertson, I. K. and Ball, M. J. 2008. Chickpeas may influence fatty acid and fiber intake in an ad libitum diet, leading to small improvements in serum lipid profile and glycemic control. *Journal of the American Dietetic Association*, 108, 1009-1013.
- Power, O., Jakeman, P. and Fitzgerald, R. J. 2013. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids*, 44, 797-820.
- Pownall, T. L., Udenigwe, C. C. and Aluko, R. E. 2010. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4712-4718.
- Puchalska, P., Marina, M. L. and Garcia, M. C. 2014. Isolation and identification of antioxidant peptides from commercial soybean-based infant formulas. *Food Chemistry*, 148, 147-154.
- Quirós, A., Chichón, R., Recio, I. and López-Fandiño, R. 2007. The use of high hydrostatic pressure to promote the proteolysis and release of bioactive peptides from ovalbumin. *Food Chemistry*, 104, 1734-1739.

- Radak, Z., Chung, H. Y., Naito, H., Takahashi, R., Jung, K. J., Kim, H. J. and Goto, S. 2004. Age-associated increase in oxidative stress and nuclear factor kappaB activation are attenuated in rat liver by regular exercise. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 18, 749-750.
- Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W.-K., Je, J.-Y. and Kim, S.-K. 2005. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, 38, 175-182.
- Rebello, C. J., Greenway, F. L. and Finley, J. W. 2014. Whole grains and pulses: a comparison of the nutritional and health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 7029-7049.
- Riordan, J. F. 2003. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome Biology*, 4, 225-225.
- Rivalain, N., Roquain, J. and Demazeau, G. 2010. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies. *Biotechnology Advances*, 28, 659-672.
- Rodríguez-Roque, M. J., De Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., Elez-Martínez, P. and Martín-Belloso, O. 2015. Impact of food matrix and processing on the in vitro bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. *Journal of Functional Foods*, 14, 33-43.
- Rosivall, L. 2009. Intrarenal renin-angiotensin system. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 302, 185-192.
- Rubattu, S., Pagliaro, B., Pierelli, G., Santolamazza, C., Castro, S. D., Mennuni, S. and Volpe, M. 2015. Pathogenesis of target organ damage in hypertension: Role of mitochondrial oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 823-839.
- Rui, X., Boye, J. I., Simpson, B. K. and Prasher, S. O. 2012. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of *Phaseolus vulgaris* bean

- hydrolysates: Effects of different thermal and enzymatic digestion treatments. *Food Research International*, 49, 739-746.
- Rui, X., Boye, J. I., Simpson, B. K. and Prasher, S. O. 2013. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides of small red bean (*Phaseolus vulgaris*) hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 5, 1116-1124.
- S Vallabha, V. and Tikku, P. K. 2014. Antihypertensive peptides derived from soy protein by fermentation. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 20, 161-168.
- Saadi, S., Saari, N., Anwar, F., Abdul Hamid, A. and Ghazali, H. M. 2015. Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. *Biotechnology Advances*, 33, 80-116.
- Safaeiyan, A., Pourghassem-Gargari, B., Zarrin, R., Fereidooni, J. and Alizadeh, M. 2015. Randomized controlled trial on the effects of legumes on cardiovascular risk factors in women with abdominal obesity. *ARYA Atherosclerosis*, 11, 117-125.
- Sagardia, I., Roa-Ureta, R. H. and Bald, C. 2013. A new QSAR model, for angiotensin I-converting enzyme inhibitory oligopeptides. *Food Chemistry*, 136, 1370-1376.
- Saito, K., Jin, D. H., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., Yasuhara, T. and Nokihara, K. 2003. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3668-3674.
- Salehi-Abargouei, A., Saraf-Bank, S., Bellissimo, N. and Azadbakht, L. Effects of non-soy legume consumption on C-reactive protein: A systematic review and meta-analysis. *Nutrition*, 31, 631-639.
- Samaranayaka, A. G. P. and Li-Chan, E. C. Y. 2011. Food-derived peptidic antioxidants. Review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 3, 229-254.

Bibliografía

- San Martín, M. F., Barbosa-Cánovas, G. V. and Swanson, B. G. 2002. Food processing by high hydrostatic pressure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 627-645.
- Sanchez-Chino, X., Jimenez-Martinez, C., Davila-Ortiz, G., Alvarez-Gonzalez, I. and Madrigal-Bujaidar, E. 2015. Nutrient and nonnutrient components of legumes, and its chemopreventive activity. Review. *Nutrition and Cancer*, 67, 401-410.
- Sarmadi, B. H. and Ismail, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins. A review. *Peptides*, 31, 1949-1956.
- Sasser, J. M., Pollock, J. S. and Pollock, D. M. 2002. Renal endothelin in chronic angiotensin II hypertension. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 283, R243-R248.
- Savijoki, K., Ingmer, H. and Varmanen, P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 394-406.
- Savoia, C., Sada, L., Zezza, L., Pucci, L., Lauri, F. M., Befani, A., Alonzo, A. and Volpe, M. 2011. Vascular inflammation and endothelial dysfunction in experimental hypertension. *International Journal of Hypertension*. Doi: 10.4061/2011/281240.
- Schaafsma, G. 2009. Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in human nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63, 1161-1168.
- Schillaci, G. and Pirro, M. 2006. C-reactive protein in hypertension: clinical significance and predictive value. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 16, 500-508.
- Schultz, M. G., Gilroy, D., Wright, L., Bishop, W. L., Abhayaratna, W. P., Stowasser, M. and Sharman, J. E. 2012. Out-of-office and central blood pressure for risk stratification: A cross-sectional study in patients treated for hypertension. *European Journal of Clinical Investigation*, 42, 393-401.
- Segura Campos, M. R., Chel Guerrero, L. A. and Betancur Ancona, D. A. 2010. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions extracted by ultrafiltration of cowpea *Vigna unguiculata*

- hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 2512-2518.
- Senaphan, K., Kukongviriyapan, U., Sangartit, W., Pakdeechote, P., Pannangpetch, P., Prachaney, P., Greenwald, S. E. and Kukongviriyapan, V. 2015. Ferulic acid alleviates changes in a rat model of metabolic syndrome induced by high-carbohydrate, high-fat diet. *Nutrients*, 7, 6446-6464.
- Shahidi, F. and Zhong, Y. 2008. Bioactive peptides. *Journal of AOAC International*, 91, 914-931.
- Shen, S., Chahal, B., Majumder, K., You, S. J. and Wu, J. 2010. Identification of novel antioxidative peptides derived from a thermolytic hydrolysate of ovotransferrin by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 7664-7772.
- Sielecki, A. R., Hayakawa, K., Fujinaga, M., Murphy, M. E., Fraser, M., Muir, A. K., Carilli, C. T., Lewicki, J. A., Baxter, J. D. and James, M. N. 1989. Structure of recombinant human renin, a target for cardiovascular-active drugs, at 2.5 Å resolution. *Science*, 243, 1346-1351.
- Sies, H. 1997. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82, 291-295.
- Singh, B. P., Viji, S. and Hati, S. 2014. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, 54, 171-179.
- Siow, H.-L. and Gan, C.-Y. 2013. Extraction of antioxidative and antihypertensive bioactive peptides from *Parkia speciosa* seeds. *Food Chemistry*, 141, 3435-3442.
- Siri-Tarino, P. W., Chiu, S., Bergeron, N. and Krauss, R. M. 2015. Saturated fats versus polyunsaturated fats versus carbohydrates for cardiovascular disease prevention and treatment. *Annual Review of Nutrition*, 35, 517-543.
- Siro, I., Kapolna, E., Kapolna, B. and Lugasi, A. 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance. Review. *Appetite*, 51, 456-567.

- Sirtori, C. R., Eberini, I. and Arnoldi, A. 2007. Hypocholesterolaemic effects of soya proteins: Results of recent studies are predictable from the anderson meta-analysis data. *British Journal of Nutrition*, 97, 816-822.
- Sirtori, C. R., Galli, C., Anderson, J. W. and Arnoldi, A. 2009. Nutritional and nutraceutical approaches to dyslipidemia and atherosclerosis prevention: Focus on dietary proteins. *Atherosclerosis*, 203, 8-17.
- Sirtori, C. R., Triolo, M., Bosisio, R., Bondioli, A., Calabresi, L., De Vergori, V., Gomaraschi, M., Mombelli, G., Pazzucconi, F., Zacherl, C. and Arnoldi, A. 2012. Hypocholesterolaemic effects of lupin protein and pea protein/fibre combinations in moderately hypercholesterolaemic individuals. *British Journal of Nutrition*, 107, 1176-1183.
- Siti, H. N., Kamisah, Y. and Kamsiah, J. 2015. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease. Review. *Vascular Pharmacology*, 71, 40-56.
- Sociedad Europea de Hipertensión Arterial. 2013. Guía práctica clínica de la ESH/ESC para el manejo de la hipertension arterial. *Hipertensión y Riesgo Cardiovascular*, 30.
- Solieri, L., Rutella, G. S. and Tagliazucchi, D. 2015. Impact of non-starter lactobacilli on release of peptides with angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidant activities during bovine milk fermentation. *Food Microbiology*, 51, 108-116.
- Stamler, J., Elliott, P., Kesteloot, H., Nichols, R., Claeys, G., Dyer, A., Stamler, R. and Group, I. C. R. 1996. Inverse relation of dietary protein markers with blood pressure findings for 10,020 men and women in the INTERSALT study. *Circulation*, 94, 1629-1634.
- Stapelfeldt, H., Petersen, P. H., Kristiansen, K. R., Qvist, K. B. and Skibsted, L. H. 1996. Effect of high hydrostatic pressure on the enzymic hydrolysis of beta-lactoglobulin B by trypsin, thermolysin and pepsin. *Journal of Dairy Research*, 63, 111-118.
- Suetsuna, K., Ukeda, H. and Ochi, H. 2000. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11, 128-131.

- Sweitzer, N. K. 2003. Cardiology patient page. What is an angiotensin converting enzyme inhibitor? *Circulation*, 108, e16-18.
- Tan, S. H., Mailer, R. J., Blanchard, C. L. and Agboola, S. O. 2011. Canola proteins for human consumption: Extraction, profile, and functional properties. *Journal of Food Science*, 76, R16-28.
- Taniyama, Y. and Griendling, K. K. 2003. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*, 42, 1075-1081.
- Teunissen-Beekman, K. F., Dopheide, J., Geleijnse, J. M., Bakker, S. J., Brink, E. J., De Leeuw, P. W. and Van Baak, M. A. 2012. Protein supplementation lowers blood pressure in overweight adults: Effect of dietary proteins on blood pressure (PROPRES), a randomized trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95, 966-971.
- Thuy, D. T. B. and Bose, S. K. 2011. Characterization of multiple extracellular proteases produced by a *Bacillus subtilis* and identification of the strain. *International Journal of Biology*, 3, 101-110.
- Ti, H., Zhang, R., Li, Q., Wei, Z. and Zhang, M. 2015. Effects of cooking and in vitro digestion of rice on phenolic profiles and antioxidant activity. *Food Research International*, 76, 813-820.
- Torres-Fuentes, C., Alaiz, M. and Vioque, J. 2014. Chickpea chelating peptides inhibit copper-mediated lipid peroxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 3181-3188.
- Torres-Fuentes, C., Contreras, M. D. M., Recio, I., Alaiz, M. and Vioque, J. 2015. Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 180, 194-202.
- Torres, J. A. and Velazquez, G. 2005. Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering*, 67, 95-112.
- Torruco-Uco, J., Chel-Guerrero, L., Martínez-Ayala, A., Dávila-Ortíz, G. and Betancur-Ancona, D. 2009. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus*

- and *Phaseolus vulgaris* seeds. *Food Science and Technology*, 42, 1597-1604.
- Tousoulis, D., Androulakis, E., Papageorgiou, N. and Stefanadis, C. 2012. Novel therapeutic strategies in the management of arterial hypertension. *Pharmacology & Therapeutics*, 135, 168-175.
- Touyz, R. M. 2004. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: What is the clinical significance? *Hypertension*, 44, 248-252.
- Touyz, R. M., Tabet, F. and Schiffrin, E. L. 2003. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 30, 860-866.
- Tovar, J., Nilsson, A., Johansson, M. and Bjorck, I. 2014. Combining functional features of whole-grain barley and legumes for dietary reduction of cardiometabolic risk: A randomised cross-over intervention in mature women. *British Journal of Nutrition*, 111, 706-714.
- Tsai, J. S., Chen, T. J., Pan, B. S., Gong, S. D. and Chung, M. Y. 2008. Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk. *Food Chemistry*, 106, 552-558.
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P. and Mahajan, R. T. 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases. Review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 7, 65-74.
- Valdez-Ortiz, A., Fuentes-Gutiérrez, C. I., Germán-Báez, L. J., Gutiérrez-Dorado, R. and Medina-Godoy, S. 2012. Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur yellow) beans (*Phaseolus vulgaris*): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization. *LWT - Food Science and Technology*, 46, 91-96.
- Vaz Patto, M. C., Amarowicz, R., Aryee, A. N. A., Boye, J. I., Chung, H.-J., Martín-Cabrejas, M. A. and Domoney, C. 2014. Achievements and challenges in improving the nutritional quality of food legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34, 105-143.
- Veenstra, J. M., Duncan, A. M., Cryne, C. N., Deschambault, B. R., Boye, J. I., Benali, M., Marcotte, M., Tosh, S. M., Farnworth, E. R. and Wright, A. J.

2010. Effect of pulse consumption on perceived flatulence and gastrointestinal function in healthy males. *Food Research International*, 43, 553-559.
- Venn, B. J., Perry, T., Green, T. J., Skeaff, C. M., Aitken, W., Moore, N. J., Mann, J. I., Wallace, A. J., Monro, J., Bradshaw, A., Brown, R. C., Skidmore, P. M., Doel, K., O'brien, K., Frampton, C. and Williams, S. 2010. The effect of increasing consumption of pulses and wholegrains in obese people: a randomized controlled trial. *Journal of the American College of Nutrition*, 29, 365-372.
- Venning, E. H. D., I., Dossetor, J. B., Beck, J. C. 1961. Essential hypertension and aldosterone. *Circulation*, 23, 168-176.
- Vernaza, M. G., Dia, V. P., De Mejia, E. G. and Chang, Y. K. 2012. Antioxidant and antiinflammatory properties of germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours. *Food Chemistry*, 134, 2217-2225.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J. and Millán, F. 2000. Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77, 447-450.
- Wada, Y. and Lönnerdal, B. 2014. Bioactive peptides derived from human milk proteins - mechanisms of action. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25, 503-514.
- Weisse, K., Brandsch, C., Zernsdorf, B., Nkengfack Nembongwe, G. S., Hofmann, K., Eder, K. and Stangl, G. I. 2010. Lupin protein compared to casein lowers the LDL cholesterol: HDL cholesterol-ratio of hypercholesterolemic adults. *European Journal of Nutrition*, 49, 65-71.
- Widmer, R. J., Flammer, A. J., Lerman, L. O. and Lerman, A. 2015. The Mediterranean diet, its components, and cardiovascular disease. *American Journal of Medicine*, 128, 229-38.
- Wu, J., Aluko, R. E. and Nakai, S. 2006. Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: Quantitative structure-activity relationship modeling of peptides containing 4-10 amino acid residues. *QSAR and Combinatorial Science*, 25, 873-880.

- Yao, F., Sun, C. and Chang, S. K. C. 2012. Lentil polyphenol extract prevents angiotensin II-induced hypertension, vascular remodelling and perivascular fibrosis. *Food & Function*, 3, 127-133.
- Yea, C. S., Ebrahimpour, A., Hamid, A. A., Bakar, J., Muhammad, K. and Saari, N. 2014. Winged bean (*Psophorcarpus tetragonolobus* L. DC) seeds as an underutilised plant source of bifunctional proteolysate and biopeptides. *Food & Function* 5, 1007-1016.
- Yin, S.-W., Tang, C.-H., Wen, Q.-B., Yang, X.-Q. and Li, L. 2008. Functional properties and in vitro trypsin digestibility of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate: Effect of high-pressure treatment. *Food Chemistry*, 110, 938-945.
- Yust, M., Pedroche, J., Giron-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F. and Vioque, J. 2003. Production of ACE inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Food Chemistry*, 81, 363-369.
- Zahradka, P., Wright, B., Weighell, W., Blewett, H., Baldwin, A., O, K., Guzman, R. P. and Taylor, C. G. 2013. Daily non-soy legume consumption reverses vascular impairment due to peripheral artery disease. *Atherosclerosis*, 230, 310-314.
- Zhang, T., Jiang, B., Miao, M., Mu, W. and Li, Y. 2012. Combined effects of high-pressure and enzymatic treatments on the hydrolysis of chickpea protein isolates and antioxidant activity of the hydrolysates. *Food Chemistry*, 135, 904-912.
- Zhao, Y., Du, S.-K., Wang, H. and Cai, M. 2014. In vitro antioxidant activity of extracts from common legumes. *Food Chemistry*, 152, 462-466.
- Zheng, L., Su, G., Ren, J., Gu, L., You, L. and Zhao, M. 2012. Isolation and characterization of an oxygen radical absorbance activity peptide from defatted peanut meal hydrolysate and its antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 5431-5437.
- Zhou, P., Yang, C., Ren, Y., Wang, C. and Tian, F. 2013. What are the ideal properties for functional food peptides with antihypertensive effect? A computational peptidology approach. *Food Chemistry*, 141, 2967-2973.