

Capítulo 3

Propiedades bioactivas de hidrolizados de gluten de trigo

Silvina Rosa Drago^{1,2}, Pablo Jorge Luggren¹, Javier Vioque Peña^{1,3}, David Betancur Ancona⁴, Luis Chel Guerrero⁴, Rolando José González¹

¹Instituto de Tecnología de Alimentos -FIQ- Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

²CONICET

³Instituto de la Grasa (CSIC), Avda. Padre García Tejero 4, 41012-Sevilla, España.

⁴Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, México.

sdrago@fiq.unl.edu.ar, luggrenpablo@yahoo.com.ar, jvioque@cica.es, bancona@uady.mx, cguerrer@uady.mx, rolgonza@fiq.unl.edu.ar

Doi: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.85>

Referenciar este capítulo

Drago, S.R., Luggren, P.J., Vioque Peña, J., Betancur-Ancona, D., Chel-Guerrero, L., & González R.J. (2013). Propiedades bioactivas de hidrolizados de gluten de trigo. En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero & D. Betancur Ancona (Eds.), *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (pp. 83-109). Barcelona: OmniaScience.

1. Introducción

Existen en el mercado fuentes proteicas que se producen como subproductos de otros procesos y que resulta interesante modificar para ampliar su uso y aumentar su valor agregado.

El gluten de trigo representa aproximadamente el 72% de las proteínas del trigo. Es un subproducto del proceso de extracción del almidón, y está disponible en grandes cantidades y relativamente a bajo costo. Las últimas cinco décadas han visto el aumento de gluten como *commodity*, debido a su producción a través de la separación industrial a gran escala del almidón de trigo, conjuntamente con su secado controlado para retener sus propiedades funcionales. El gluten seco vital resultante es el más ampliamente utilizado en productos de panadería. Sin embargo, tanto el gluten vital (aquel que conserva sus propiedades viscoelásticas) como el modificado han encontrado un uso creciente como ingredientes alimentarios, brindando una gama de propiedades funcionales a un precio más modesto que el de otros ingredientes proteicos tales como la leche y las proteínas de soja (Day, Augustin, Batey & Wrigley, 2006).

El gluten vital se usa principalmente en la industria panadera, como mejorador de harinas débiles o para productos especiales que requieren alta concentración de gluten. El valor del gluten en esta aplicación depende de sus propiedades funcionales de cohesividad, viscoelasticidad y capacidad de formar films que retienen gas y humedad. Su propiedad cohesiva más su habilidad de amoldarse por calor lo hacen útil como ligante y texturizante en carnes y en proteínas vegetales texturizadas (Pecquet & Lauriere, 2003).

En todos estos roles las propiedades funcionales ligadas con la viscoelasticidad o vitalidad del gluten son de principal importancia (Popineau, Huchet, Larré & Bérot, 2002). Sin embargo, el gluten posee una baja solubilidad que limita su aplicación en distintos sistemas alimentarios. Por este motivo se han estudiado distintas alternativas para modificar su estructura y funcionalidad como la deamidación (Mimouni, Raymond, Merle-Desnoyers, Azanza & Ducastaing, 1994), la acetilación (Żukowska, Rudnik & Kijeński, 2008; Majzoobi, Abedi, Farahnaky & Aminlari, 2012) y la hidrólisis enzimática (Drago & González, 2001; Kong, Zhou & Qian, 2007a; 2007b). Otros estudios combinan la hidrólisis con tratamientos previos, evaluando la susceptibilidad de gluten modificado por deamidación a la hidrólisis enzimática (Liao, Qiu, Liu, Zhao, Ren & Zhao 2010; Liao, Wang & Zhao, 2012), la hidrólisis de gluten modificado por extrusión (Cui, Cui, Zhao, Zhao, & Chai, 2011); tratado térmicamente (Drago, González & Añón, 2008a; Wang, Wei, Li, Bian & Zhao, 2009; Zhang, Claver, Li, Zhu, Peng & Zhou, 2012), tratado por sonicación (Jin, Wang & Bian, 2011), entre otros.

Respecto a las propiedades funcionales de hidrolizados de gluten se han estudiado propiedades de solubilidad y de superficie, tales como espumado y emulsificación (Drago, González & Añón, 2008b y 2011; Kong, Zhou & Qian, 2007b; Wang, Zhao, Yang & Jiang, 2006; Mimouni et al., 1994), capacidad adhesiva (Nordqvista, Lawtherb, Malmströma & Khabbazc, 2012) y propiedades reológicas (Zhang, Li, Claver, Zhu, Peng & Zhou, 2010).

Por otra parte, la hidrólisis enzimática utilizando enzimas comerciales es una de las alternativas que permiten obtener péptidos bioactivos, conjuntamente con el proceso de fermentación y la digestión gastrointestinal *in vivo*. Los péptidos funcionales son parcialmente resistentes a la hidrólisis y son capaces de ejercer un efecto a nivel local en el tubo digestivo, o bien a distancia

en el organismo, una vez que han ingresado en el sistema circulatorio (Fox & Flynn, 1992; Tirelli, De Noni & Resmini, 1997). Los péptidos producidos tienen características que dependen de la proteína hidrolizada (sustrato), de la enzima y de condiciones de hidrólisis (pH, temperatura, relación E/S, tiempo) que determinan el grado de hidrólisis (GH). Los péptidos pueden tener diferentes tipos de propiedades bioactivas, entre las que se destacan la inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina I (ECA), que puede ser asociada a un efecto anti-hipertensivo, y las propiedades antioxidantes.

La hipertensión arterial es un problema de gran importancia socio-sanitaria, y constituye uno de los principales factores de riesgo cardiovascular (Chockalingam, 2008). Uno de los mecanismos antihipertensivos es la inhibición de la ECA I, que desempeña un papel muy importante en la regulación de la presión arterial (Torruco-Uco, Domínguez-Magaña, Dávila-Ortiz, Martínez-Ayala, Chel-Guerrero & Betancur-Ancona, 2008).

Los hidrolizados proteicos pueden presentar actividad antihipertensiva por este mecanismo y ser usados como ingredientes biofuncionales o nutraceuticos, es decir como productos que tienen un efecto sobre la salud que va más allá de las propiedades nutricionales.

Por otra parte, los antioxidantes (AO) son adicionados durante el procesamiento de los alimentos para mejorar su estabilidad y calidad. Estos pueden actuar a través de diferentes mecanismos: deteniendo la reacción en cadena de oxidación de las grasas mediadas por radicales libres, eliminando el oxígeno disuelto en el producto o complejando metales traza que facilitan la oxidación (Calvo Rebolgar, 1991). Los hidrolizados proteicos pueden presentar actividad antioxidante (AAO) y ser usados en sistemas de alimentos como aditivos o como ingredientes nutraceuticos.

Sin embargo, los trabajos referidos a propiedades bioactivas de gluten son escasos. Entre ellos se puede citar el estudio de propiedades bioactivas AO de péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática bajo ultrasonido (Zhu, Su, Guo, Peng & Zhou, 2011), donde observaron que el gluten hidrolizado bajo ultrasonido de baja frecuencia exhibió las mayores actividades AO, con valores de capacidad equivalente (EC_{50}) de 0.513 mg/mL para la capacidad quelante del ión ferroso. También se observaron propiedades AO de fracciones ultrafiltradas por membranas de 5 kDa de corte, de hidrolizados obtenidos utilizando papaína (Wang, Zhao, Zhao & Jiang, 2007). En este caso tanto las fracciones permeadas como retenidas mostraron actividad AO mayor que el hidrolizado de origen. Cui, Kong, Hua, Zhou y Liu (2011) también evaluaron propiedades AO de hidrolizados obtenidos en un reactor con membrana de ultrafiltración y observaron que las fracciones permeadas (< 1000 Da) fueron homogéneas, estables y mostraron fuerte actividad AO.

En estos trabajos se evalúan la AAO de fracciones obtenidas en un hidrolizado de grado de hidrólisis determinado. Sin embargo, no se han encontrado estudios que midan el efecto del grado de hidrólisis en las propiedades bioactivas de fracciones obtenidas por solubilización por pH de hidrolizados de gluten de trigo.

Los objetivos de este trabajo fueron obtener extractos de hidrolizados proteicos de gluten de trigo de diferente grado de hidrólisis por medio de fraccionamientos por pH y evaluar la

presencia de propiedades bioactivas antioxidantes (AAO) e inhibidora de ECA (propiedades antihipertensivas) en dichos extractos.

2. Materiales y Métodos

2.1. Gluten

Se utilizó gluten de trigo comercial provisto por Molinos Semino S.A. Carcarañá - Santa Fe, siendo su composición en base seca: humedad: 5.95%, proteínas: 77.20% (factor de conversión proteína/ N total = 5.7), almidón: 13.15%, lípidos: 0.71% y cenizas: 0.83%.

El gluten vital comercial fue tratado térmicamente según el protocolo de Drago et al. (2008a), obteniéndose el gluten de trigo tratado térmicamente (GTT).

2.2. Hidrolizados de gluten de trigo

Los hidrolizados de GTT fueron previamente producidos en condiciones definidas de pH, temperatura y tiempo de hidrólisis empleando un reactor termostatzado de tipo batch de 800 ml de capacidad. El pH de reacción fue medido de manera continua utilizando un pHmetro IQ Scientific Instruments. El ajuste de pH se realizó mediante el agregado de base (NaOH) o ácido (HCl). Las enzimas empleadas fueron alcalasa (Al) y acidasa (Ac) utilizando una relación E/S de 0.1% y 5%, respectivamente (Drago et al., 2008b).

El avance de la reacción se siguió mediante el índice de tricloroacético (ITCA) que se determinó midiendo el N soluble en ácido TCA al 20% y se calculó en relación al contenido de N total en la muestra (N_{total}), según Ecuación 1:

$$ITCA = \frac{100 \times N_{soluble} \text{ TCA } 20\%}{N_{total}} \quad (1)$$

Ecuación 1. Índice de Tricloro Acético

Para cada enzima se produjeron hidrolizados de tres diferentes grados de hidrólisis con valores de ITCA de: 14%, 22% y 32.6%.

2.3. Fraccionamiento por pH

Las fracciones proteicas fueron obtenidas por solubilización a pHs: 4, 6.5 y 9, según Drago y González (2001). Para ello, se prepararon soluciones al 2% (p/p) en base seca de los diferentes hidrolizados y del GTT. El pH se obtuvo por adición de HCl 0.4 mol/ L o NaOH 0.1-3.0 mol/ L. Las muestras fueron agitadas durante 1h a temperatura ambiente y posteriormente centrifugadas por 15 min a 8,000xg. Los sobrenadantes (los extractos a cada pH) fueron liofilizados en un equipo Flexi-Dry™ MP FTS systems.

2.4. Análisis de las fracciones

A las fracciones obtenidas por extracción por pH de los hidrolizados de gluten se les determinó el contenido de proteínas y aminos libres.

2.5. Determinación del contenido de proteínas

Se siguió la técnica de Lowry, Rosebrough, Farr y Randall (1951).

2.6. Evaluación de actividad antioxidante (AAO)

Se utilizó el método propuesto por Pukalskas, van Beek, Venskutonis, Linssen, van Veldhuizen y de Groot (2002) que utiliza el radical $ABTS^{*+}$, para medios acuosos y que se basa en su decoloración por los péptidos antioxidantes. El porcentaje de inhibición se calculó midiendo la Absorbancia del $ABTS^{*+}$ (Ab : absorbancia del blanco) y de la muestra (Am) a los 6 min de reacción, según la Ecuación 2.

$$\%Inhibición \text{ del radical } ABTS^{*+} = \frac{(Ab - Am)}{Ab} \times 100 \quad (2)$$

Ecuación 2. Cálculo del porcentaje de inhibición del radical catión $ABTS^{+}$*

Para el cálculo de la capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC), el% Inhibición se refirió a mmoles de Trolox utilizando una curva de calibrado de 0.5-3.5 mM de Trolox, y el resultado de TEAC se expresó como los mmoles de Trolox equivalentes por g de proteínas del extracto.

Se calculó la concentración que bloquea el 50% del radical $ABTS^{*+}$ (IC_{50}), asumiendo que la actividad del blanco es 100%. Las curvas de dosis-inhibición se generaron como la concentración de inhibidor (abscisa) versus el% de inhibición del radical $ABTS^{*+}$ (ordenada). La función *BoxLucas1* del *Software OriginLab 8* (3) ajustó a los datos experimentales:

$$y = a(1 - e^{-b \cdot x}) \quad (3)$$

Ecuación 3. Función BoxLucas1 para ajuste a los datos experimentales de la curva dosis-inhibición

Siendo:

y: % de inhibición del radical $ABTS^{*+}$

x: concentración de la muestra (inhibidor)

a y b: coeficientes de ajuste

Para obtener el valor de la IC_{50} correspondiente, se le asignó a y el valor de 50% de inhibición de la actividad oxidante y se despejó x de la ecuación, que corresponde al valor de la IC_{50} , (Ecuación 4):

$$x = - \frac{\ln\left(1 - \frac{50}{a}\right)}{b} \quad (4)$$

Ecuación 4. Ecuación utilizada para el cálculo de la IC_{50} de capacidad antioxidante

2.7. Evaluación de actividad de inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina I (ECA I): actividad anti-hipertensiva (AAH)

Se siguió la técnica propuesta por Hayakari, Kondo y Izumi (1978). El resultado se expresó según las ecuaciones 5 y 6.

$$Actividad \ ECA = \frac{(A_{MES} - A_{BME})}{(A_{ES} - A_{BES})} \times 100 \quad (5)$$

$$\% \text{ de inhibición de la ECA} = 100 - Actividad \ ECA \quad (6)$$

Ecuaciones 5 y 6. Ecuaciones utilizadas para el cálculo del porcentaje de inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina I (ECA)

Siendo:

A^{MES} : la absorbancia de la mezcla muestra, enzima y sustrato

A^{BME} : la absorbancia del blanco de muestra.

A^{ES} : la absorbancia de la enzima y el sustrato

A^{BES} : la absorbancia del blanco de enzima y sustrato

La concentración que inhibe el 50% de la actividad de la ECA (IC_{50}) se calculó utilizando el método propuesto por Vermeirssen, Van Camp y Verstraete (2002), asumiendo que la actividad del blanco es 100%. Las curvas de dosis-inhibición se generaron como LOG [concentración de inhibidor] (abscisa) versus inhibición de la ECA (ordenada). La función *DoseResp* del *Software OriginLab 8* (Ecuación 7) ajustó los datos experimentales:

$$Y = A1 + \frac{A2 - A1}{1 + 10^{(LOG x0 - x)p}} \quad (7)$$

Ecuación 7. Función DoseResp para ajuste a los datos experimentales de la curva dosis inhibición de ECA I

Siendo:

Y: % de inhibición de la ECA

x: concentración de la muestra

LOG x0: LOG IC₅₀

A1: línea de base (equivalente a 100% de actividad de la ECA)

A2: línea de saturación (equivalente a 100% de inhibición de la ECA)

p: *hill slope* (pendiente del centro de transición de la curva)

El software entrega el valor del coeficiente LOG x0 con el que se puede calcular la IC₅₀ siguiendo la Ecuación 8:

$$IC_{50} = 10^{LOG x0} \quad (8)$$

Ecuación 8. Ecuación utilizada para el cálculo de la IC₅₀ de capacidad de inhibición de ECA I

2.8. Estudios Estadísticos

Todas las muestras se procesaron por triplicado. Se realizó el test de ANOVA (*Analysis of Variance*) para determinar diferencias significativas entre muestras ($p < 0.05$) y test de LSD (*Least Significant Difference*) para comparación de a pares al 5% de nivel significancia, utilizando el Software Statgraphics Centurion XV. El ANOVA multifactor se realizó para evaluar los factores: grado de hidrólisis y pH de extracción, siendo las variables de respuesta la actividad antioxidante y la actividad antihipertensiva.

Otros análisis de regresión simple y algunas representaciones gráficas se realizaron por medio de OriginLab 8 y de la planilla de cálculo de Microsoft Office Excel 2007.

3. Resultados y discusión

3.1. Evaluación de propiedades bioactivas de hidrolizados de Gluten de Trigo

Como se mencionó en materiales y métodos, se elaboraron hidrolizados de gluten de trigo utilizando dos enzimas diferentes (acidasa y alcalasa) y a tres grados de hidrólisis distintos para cada enzima (ITCA: 14, 22 y 32.6%). El análisis de las propiedades bioactivas de estos hidrolizados (actividad antioxidante e inhibidora de ECA) se realizó sobre extractos de pH 4, 6.5 y 9 de cada uno de estos hidrolizados y de la muestra de partida GTT sin hidrolizar.

3.1.1 Actividad antioxidante

Hidrolizado de gluten de trigo obtenidos con la enzima acidasa (Ac)

Dado que las muestras (extractos liofilizados de los hidrolizados a los 3 pHs seleccionados: 4, 6.5 y 9) no se solubilizaron totalmente en el buffer PBS que se utiliza para la determinación de la actividad antioxidante, se preparó una dispersión de los extractos liofilizados en PBS, y a la fracción soluble se le determinó el contenido de amino libres, de proteínas y la actividad antioxidante. En la Figura 1 se muestran los resultados de actividad antioxidante (AO) de los distintos extractos.

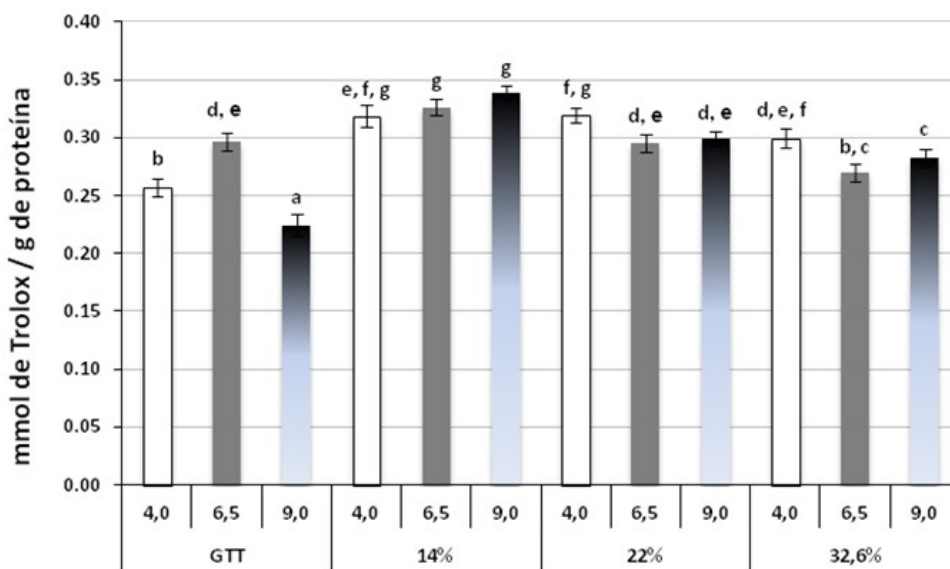


Figura 1. Actividad antioxidante de los extractos de los hidrolizados de gluten de trigo con Ac de ITCA: 14, 22 y 32.6% y del gluten sin hidrolizar tratado térmicamente (GTT). Letras diferentes implican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$)

Los extractos de los hidrolizados presentaron en general mayor AAO que los extractos de GTT. También se observó que los extractos de la muestra de ITCA de 14% presentaron los mayores

valores de AAO, aunque el extracto de pH 4 de la muestra de ITCA de 22% presentó un valor de AAO, semejante a los extractos del hidrolizado de 14%.

El ANOVA multifactor (Tabla 1) mostró diferencias significativas con el grado de hidrólisis, siendo la muestra de ITCA de 14% la de mayor actividad.

Factor GH	Actividad AO (mmol de Trolox/g de Proteína)	Grupos Homogéneos
0%	0.264 ± 0.007	a
14%	0.328 ± 0.007	d
22%	0.306 ± 0.006	c
32.6%	0.284 ± 0.006	b

Tabla 1. ANOVA Multifactor para la actividad antioxidante (AAO) según el factor grado de hidrólisis (GH) a diferentes valores de pH de extracción. Letras diferentes implican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$)

Si bien algunos extractos de pH presentaron más actividad que otros, el ANOVA multifactor no mostró un efecto significativo del pH. Sin embargo, para las muestras de mayor ITCA (22 y 32.6%), los extractos de pH 4 presentaron mayor actividad que a los otros pHs.

Por otra parte, cuanto mayor fue el grado de hidrólisis mayor fue la solubilidad en PBS de los extractos liofilizados. Por este motivo, los resultados se expresaron considerando el contenido de proteína de la dispersión en PBS.

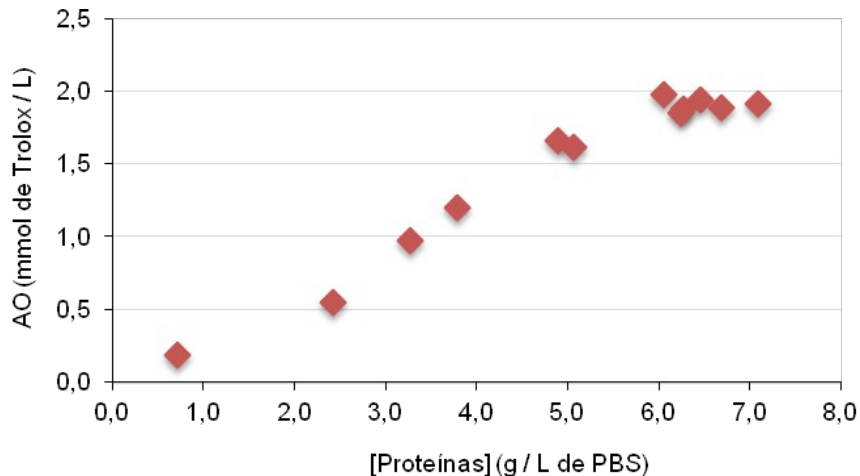


Figura 2. Actividad antioxidante expresada en mM de Trolox vs. Concentración de proteínas en buffer PBS

Cuando se consideró la actividad antioxidante en mM de Trolox, se puede observar que la misma aumenta con la concentración de proteína, obteniéndose un valor semejante cuando las muestras tienen un contenido proteico mayor de 6 g/ L (Figura 2).

La misma tendencia fue observada cuando se graficó la actividad antioxidante en función de la concentración de aminos libres, observándose valores semejantes a partir de 4.7 mEq L-Ser / L de PBS (Figura 3).

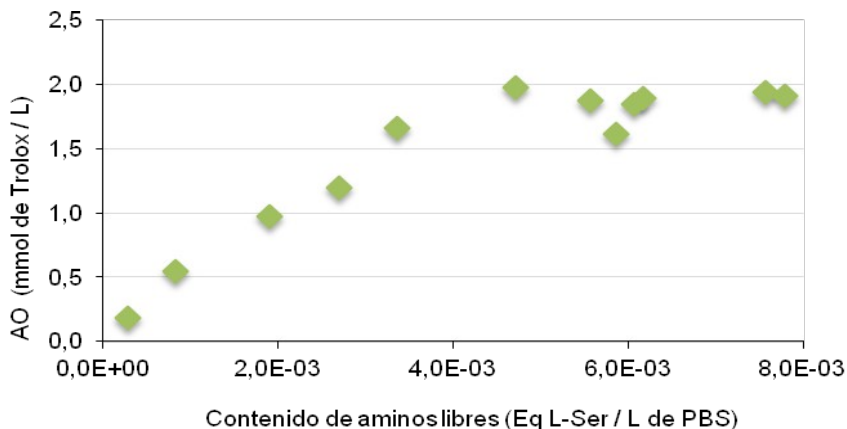


Figura 3. Actividad antioxidante expresada en mM de Trolox vs. Concentración de proteínas en buffer PBS

Esto se debería a que al aumentar el grado de hidrólisis no sólo aumenta la solubilidad del hidrolizado sino que también la composición de los extractos a los distintos pHs se torna semejante (Drago et al., 2008a).

Muestras	pH	Solubilidad
GTT	4.0	58.04 ± 0.41 ^d
	6.5	5.88 ± 0.13 ^h
	9.0	25.58 ± 0.88 ^g
ITCA 14%	4.0	80.47 ± 0.28 ^{a, b}
	6.5	35.87 ± 0.06 ^f
	9.0	57.77 ± 0.37 ^d
ITCA 22%	4.0	81.01 ± 0.50 ^a
	6.5	53.74 ± 0.32 ^e
	9.0	73.88 ± 0.63 ^c
ITCA 32.6%	4.0	77.58 ± 0.16 ^{a, b}
	6.5	67.54 ± 0.59 ^{b, c}
	9.0	79.94 ± 0.06 ^a

Tabla 2. Solubilidad del gluten sin hidrolizar tratado térmicamente (GTT) y de los hidrolizados de ITCA (índice de tricloroacético): 14, 22 y 32.6%. (Drago et al., 2008a). Letras diferentes implican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$)

En la Tabla 2 se muestra la solubilidad a los distintos pH de los hidrolizados (Drago et al., 2008a). Debido a que la muestra de ITCA 14% tiene menor solubilidad que las otras muestras hidrolizadas, el extracto de pH 4 de la muestra de ITCA 22% podría considerarse interesante como fuente de péptidos antioxidantes, ya que permitiría obtener mayores rendimientos en lo que respecta a su producción.

Del *screening* de AAO realizado a todas las muestras, se seleccionó el extracto ITCA 22% pH 4 para realizar la determinación de la concentración que bloquea el 50% del radical ABTS^{•+} (IC₅₀). Se seleccionó este extracto de entre aquellos que presentaron mayor valor de actividad AO porque es el que presentó una mayor solubilidad, lo que permitiría obtener un mayor rendimiento de péptidos AO a partir de hidrolizados del gluten con la enzima Ac.

En la Figura 4 se pueden observar los valores del% de inhibición del radical ABTS^{•+} a las distintas concentraciones en buffer PBS, del extracto de pH 4 del hidrolizado de ITCA 22%.

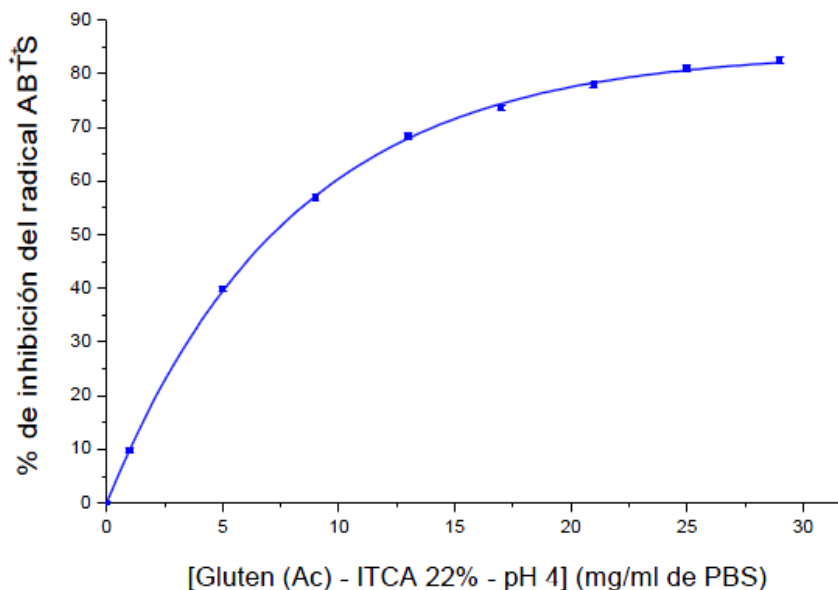


Figura 4. Actividad antioxidante del extracto de pH 4 del hidrolizado de gluten con Ac de ITCA 22%, expresada en% de inhibición del radical ABTS^{•+} vs. Concentración de proteínas en buffer PBS

En la Tabla 3 se pueden observar los valores obtenidos para los coeficientes de ajuste de los datos experimentales para el cálculo de la IC₅₀.

Ecuación	y = a*(1 - exp(-b*x))		
R ² -ajustado	0.99978		
		Valor	Error Estándar
Media% Inhibición	a	84.2	0.4
Media% Inhibición	b	0.126	0.002

Tabla 3. Valores de ajuste de datos experimentales con la función BoxLucas1

La IC₅₀ obtenida para el extracto de pH 4 del hidrolizado de gluten con Ac de ITCA 22%, fue de 7.1 mg/ml de PBS.

En resumen, una hidrólisis suave permitió obtener muestras con buenas propiedades AO. Sin embargo, si la hidrólisis continúa, las propiedades antioxidantes disminuyen. El fraccionamiento por pH no permitió concentrar la actividad en la muestra de bajo grado de hidrólisis (14%), pero fue efectiva en los hidrolizados de mayor ITCA, obteniéndose mayor actividad en las fracciones de pH 4.

Hidrolizado de gluten de trigo obtenidos con la enzima alcalasa (Al)

Para estos hidrolizados se procedió de igual manera que para los hidrolizados de gluten de trigo con la enzima Ac. Se preparó una dispersión al 1% en PBS, y se le determinó la AAO.

En la Figura 5 se muestran los resultados de la AAO de los distintos extractos de los hidrolizados y de GTT.

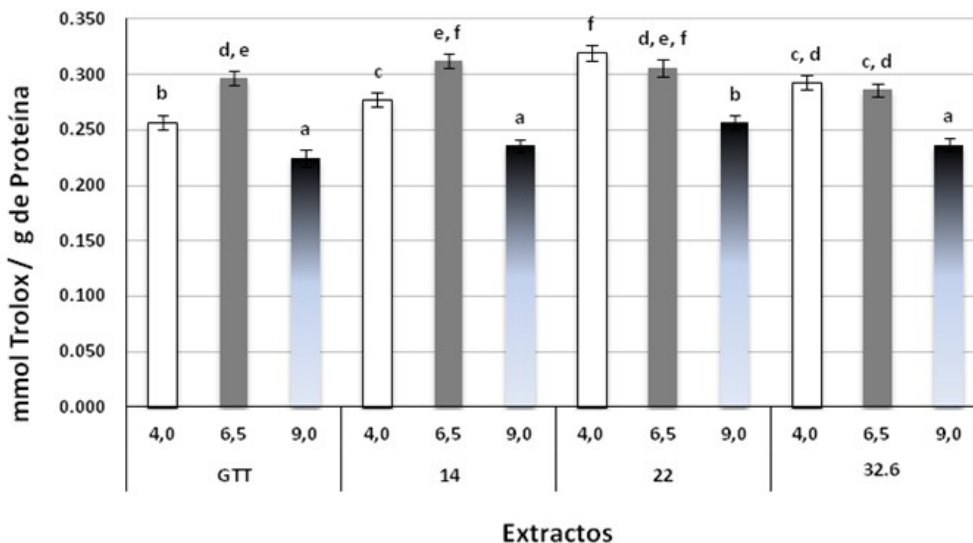


Figura 5. Actividad antioxidante de los extractos de los hidrolizados de gluten de trigo con Al de ITCA: 14, 22 y 32.6% y del gluten sin hidrolizar tratado térmicamente (GTT). Letras diferentes implican diferencias significativas entre las muestras (p < 0.05)

En general, los extractos de los hidrolizados presentaron mayor AAO que los extractos de GTT.

El ANOVA multifactor (Tabla 4) mostró diferencias significativas con el grado de hidrólisis, siendo la muestra de ITCA de 22% la de mayor actividad.

Para los hidrolizados de gluten con Al se observaron diferencias significativas (p < 0.05) debidas al pH de extracción, siendo el pH 6.5 el que presentó la mayor AAO (Tabla 5). Sin embargo, uno de los valores más altos de AAO se observó para el extracto de pH 4 de la muestra de ITCA de 22%.

Factor GH	Actividad AO (mmol de Trolox/g de Proteína)	Grupos Homogéneos
0%	0.259 ± 0.005	a
14%	0.275 ± 0.005	b
22%	0.294 ± 0.005	c
32.6%	0.272 ± 0.005	a, b

Tabla 4. ANOVA Multifactor para la actividad antioxidante (AAO) según el factor grado de hidrólisis (GH) a diferentes valores de pH de extracción. Letras diferentes implican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$)

Factor pH	Actividad AO (mmol de Trolox/g de Proteína)	Grupos Homogéneos*
4	0.285 ± 0.004	b
6.5	0.301 ± 0.004	c
9	0.238 ± 0.004	a

Tabla 5. ANOVA Multifactor para la actividad antioxidante (AAO) según el factor pH de extracción a diferentes valores de grado de hidrólisis. * Letras diferentes implican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$)

De entre los extractos que presentaron los mayores valores de actividad AO, se seleccionó el extracto ITCA 22% pH 4 para realizar la determinación de la concentración de la IC₅₀ (concentración que bloquea el 50% del radical ABTS^{•+}), a los fines de comparar con el extracto de pH 4 del hidrolizado de ITCA 22%, obtenido con la otra enzima (Ac).

En la Figura 6 se pueden observar los valores de la AAO expresada en% de inhibición del radical ABTS^{•+}, con respecto a las distintas concentraciones de las dispersiones en buffer PBS, del extracto de pH 4 del hidrolizado de ITCA 22% obtenido con Al.

En la Tabla 6 se pueden observar los valores obtenidos para los coeficientes de ajuste de los datos experimentales para el cálculo de la IC₅₀.

Ecuación	$y = a*(1 - \exp(-b*x))$		
R ² ajustado	0.99541		
		Valor	Error Estándar
Media% Inhibición	a	95	2
Media% Inhibición	b	0.156	0.009

Tabla 6. Valores de ajuste de datos experimentales con la función BoxLucas1

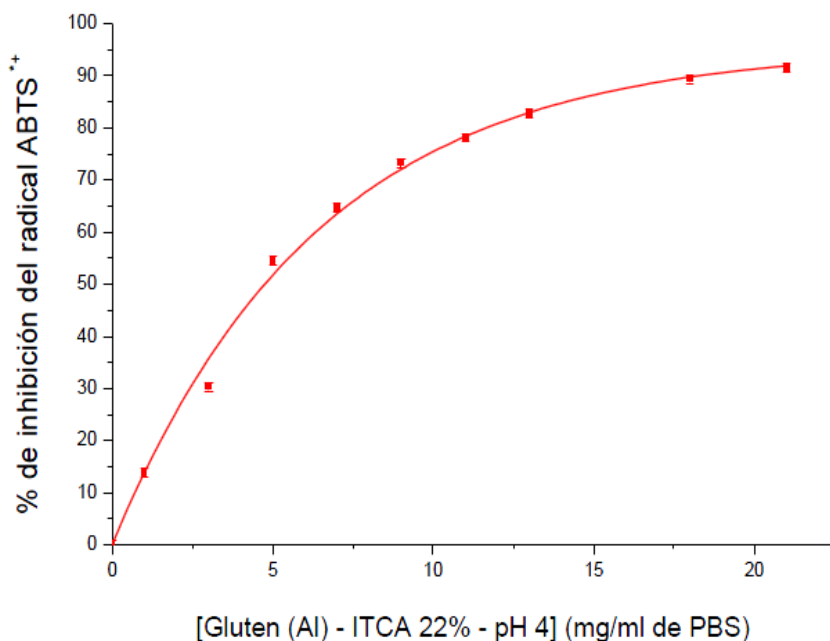


Figura 6. Actividad antioxidante del extracto de pH 4 del hidrolizado de gluten con Al de ITCA 22%, expresada en% de Inhibición del radical ABTS*+ vs. Concentración de proteínas en buffer PBS

La IC₅₀ obtenida para el extracto de pH 4 del hidrolizado de gluten con la enzima Al de ITCA 22%, fue de 4.8 mg/ ml de PBS.

En resumen, una hidrólisis suave permitió obtener muestras con buenas propiedades AO, sin embargo, si la hidrólisis continúa, las propiedades antioxidantes disminuyen. El fraccionamiento por pH permitió concentrar la AAO de los extractos, obteniéndose mayor actividad en las fracciones de pH 6.5.

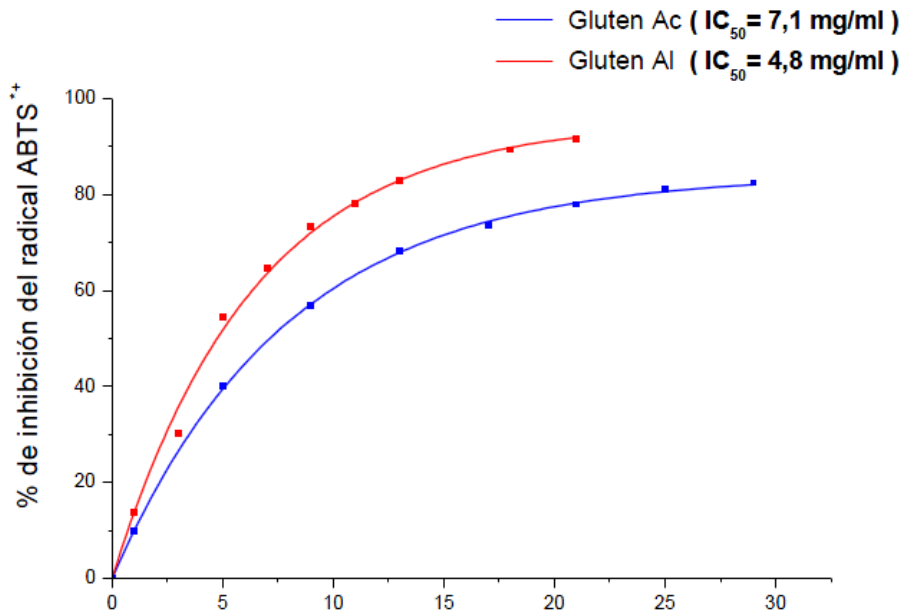
Comparación de la AAO de hidrolizados de gluten de trigo obtenidos con distintas enzimas

Comparando los valores de AAO obtenidos a las distintas concentraciones utilizadas para determinar la IC₅₀, se puede observar en la Figura 7 que el extracto de pH 4 del hidrolizado de gluten de trigo de ITCA 22%, obtenido con la enzima Al alcanzó valores de AAO superiores a aquellos obtenidos con la enzima Ac (aproximadamente un 13% más). Además, el hidrolizado de Al llega a saturación a una mayor velocidad, obteniéndose así un valor de IC₅₀ menor, que implica una mayor AAO.

Los valores de AAO de los extractos de pH 4 de los hidrolizados de gluten de trigo obtenidos con Al o Ac (IC₅₀ = 4.8 y 7.1 mg/ ml, respectivamente) fueron menores a los valores alcanzados en hidrolizados de proteínas de germen de trigo (IC₅₀ = 1.3 mg / ml) (Zhu, Zhou & Qian, 2006), hidrolizados de proteínas de garbanzo (IC₅₀ aprox. 1.0 mg / ml) obtenidos con alcalasa (Li, Jiang,

Zhang, Mu & Liu, 2008), hidrolizado de cáñamo ($IC_{50} = 2.3-2.4$ mg/ ml) obtenidos con neutrasa después de 3-4 h de hidrólisis (Wang, Tang, Chen & Yang, 2009) y valores similares en hidrolizados de hemoglobina obtenidos con alcalasa después de 4-10 h (Chang, Wu & Chiang, 2007) e hidrolizados de proteína de canola obtenidos con alcalasa y/o flavorzima (Cumby, Zhong, Naczk & Shahidi, 2008).

Además, el fraccionamiento por pH fue efectivo para concentrar la AAO de hidrolizados con AI, no ocurriendo lo mismo para todos los hidrolizados obtenidos con la Ac. También fueron diferentes los grados de hidrólisis que presentaron la mayor actividad entre los hidrolizados de ambas enzimas, siendo el hidrolizado de ITCA 14% y el de ITCA 22% para los hidrolizados de Ac y AI, respectivamente. En general, se ha observado que la AAO no guarda correlación con el grado de hidrólisis (Zhu et al., 2011), aunque está asociada a la presencia de componentes de bajo peso molecular (Wang et al., 2007; Cui, Kong et al., 2011; Cumby, Zhong, Naczk & Shahidi, 2011).



Hidrolizado de gluten Ac, AI según corresponda, ITCA 22%, pH4 (mg/ml)

Figura 7. Actividad antioxidante (AAO) de los extractos de pH 4 de los hidrolizados de gluten de trigo de ITCA 22% obtenidos con las enzimas AI y Ac, expresada en % Inhibición del radical ABTS vs. Concentración de proteínas en PBS

Las diferencias observadas en la AAO de los hidrolizados se deben a que la naturaleza de los péptidos obtenidos por fraccionamiento por pH es diferente según sea la enzima utilizada para obtener los hidrolizados y al grado de hidrólisis alcanzado, como fue mostrado por Drago et al. (2008b).

Actividad inhibidora de ECA

Hidrolizados de gluten de trigo obtenidos con la enzima acidasa (Ac)

Factor GH	Media	Grupos homogéneos*
0%	-12 ± 3	a
14,0%	53 ± 3	b
22,0%	59 ± 3	b
32.6%	54 ± 3	b

Tabla 7. ANOVA Multifactor para el% de inhibición de la ECA según el factor grado de hidrólisis (GH) a diferentes valores de pH de extracción. * Letras diferentes implican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$)

En la Figura 8 se muestran los resultados de actividad inhibidora de la ECA, de los distintos extractos de los hidrolizados de gluten de trigo con acidasa. Los extractos de los hidrolizados presentaron AAH, mientras que los extractos de GTT no poseen dicha actividad. El ANOVA multifactor (Tabla 7) no mostró diferencias significativas con el grado de hidrólisis, pero sí entre los extractos hidrolizados y aquellos sin hidrolizar (GH 0%).

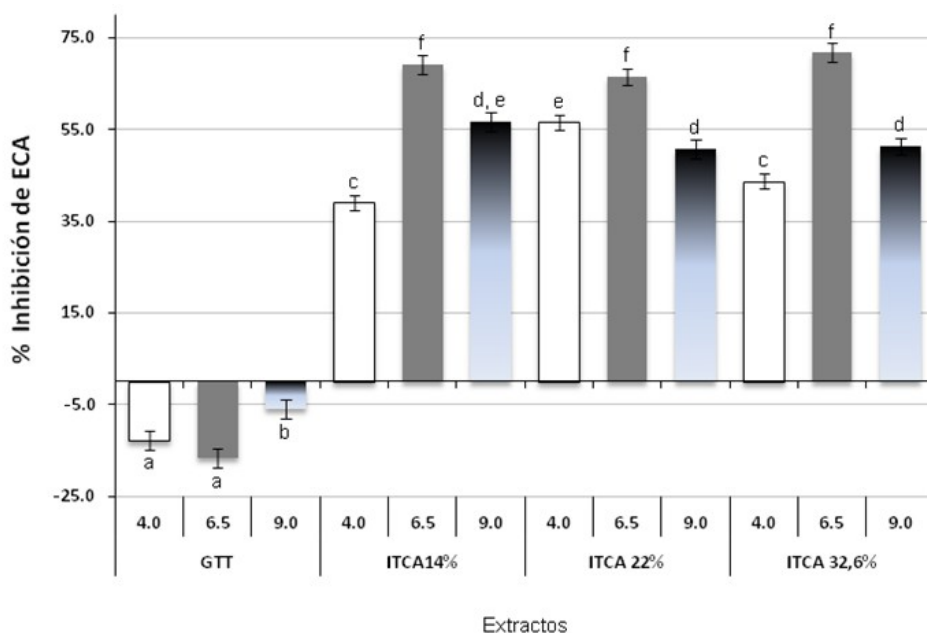


Figura 8. Actividad antihipertensiva de los extractos de los hidrolizados de acidasa de ITCA: 14, 22 y 32.6% y del gluten sin hidrolizar tratado térmicamente (GTT). Letras diferentes implican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$)

Considerando sólo las muestras que presentaron AAH, se realizó el ANOVA multifactor, relacionando el pH de extracción con el% de inhibición de la ECA (Tabla 8).

Factor pH	Media	Grupos homogéneos*
4.0	46 ± 2	a
6.5	68 ± 2	c
9.0	53 ± 2	b

Tabla 8. ANOVA Multifactor para el% de inhibición de la ECA según el factor pH de extracción a diferentes valores de grados de hidrólisis. * Letras diferentes implican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$)

Este análisis mostró un efecto significativo del pH, siendo el pH de extracción 6.5 el que presentó mayor actividad y las fracciones proteicas obtenidas a pH 4 las que presentaron una menor actividad.

De este *screening* de AAH realizado a todas las muestras, se seleccionó el extracto de pH 6.5 del hidrolizado de ITCA 32.6% para realizar la determinación de la concentración de la IC₅₀. Si bien todos los extractos a pH 6.5 presentaron mayor AAH, se seleccionó esta muestra porque presenta una solubilidad mayor con respecto a los demás extractos de pH 6.5 (Tabla 2), lo que permitiría obtener un mayor rendimiento en la obtención de péptidos inhibidores de ECA de hidrolizados de gluten con la enzima Ac.

En la Figura 9 se pueden observar los valores de inhibición de la ECA (%) correspondientes al LOG de las distintas concentraciones del extracto de pH 6.5 del hidrolizado de ITCA 32.6% obtenido con acidasa.

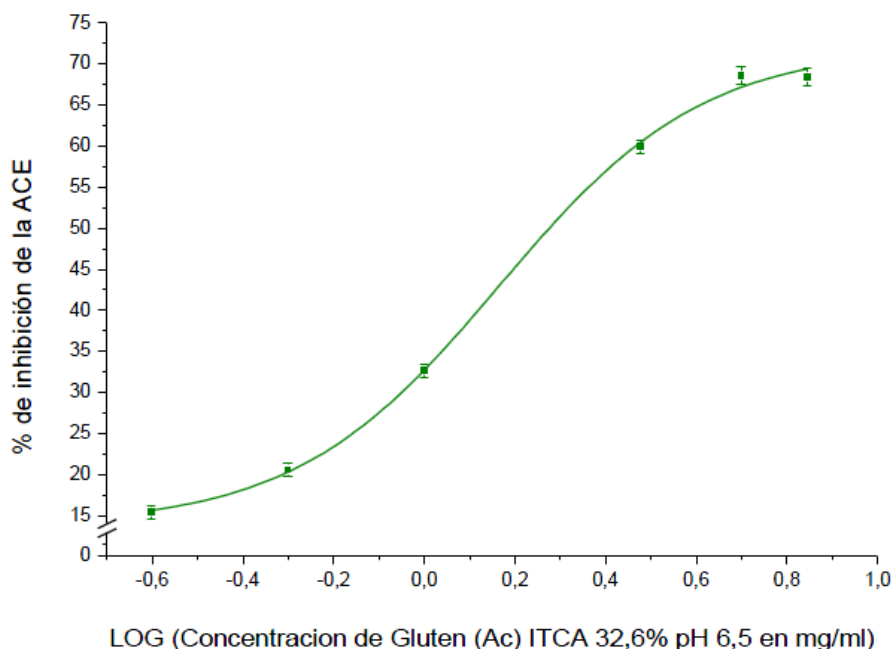
En la Tabla 9 se pueden observar los valores obtenidos para los coeficientes de ajuste de los datos experimentales para el cálculo de la IC₅₀.

La IC₅₀ obtenida para el extracto de pH 6.5 del hidrolizado de gluten de ITCA 32,6%, obtenido con acidasa fue de 1.4 mg/ ml.

Ecuación	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOG}x0-x)*p))}$	
R ² ajustado	0.99718	
	Valor	Error Estándar
A1	14	2
A2	72	2
LOGx0	0.16	0.03
p	1.9	0.3
IC ₅₀	1.4	

Tabla 9. Valores de ajuste de datos experimentales con la función DoseResp

En resumen, el gluten de trigo tratado térmicamente no presentó actividad inhibidora de ECA. La hidrólisis del gluten de trigo permitió obtener productos con buenas propiedades AH, pero no se observaron diferencias significativas entre los distintos grados de hidrólisis. El fraccionamiento por pH permitió concentrar la actividad en las muestras hidrolizadas, obteniéndose mayor actividad en las fracciones de pH 6.5.



LOG (Concentración de Gluten (Ac) ITCA 32,6% pH 6,5 en mg/ml)
 Figura 9. Inhibición de la ECA (%) vs. LOG de la concentración de proteínas en mg/ml del extracto pH 6.5 del hidrolizado de ITCA 32,6% de acedasa

Hidrolizado de gluten de trigo obtenidos con la enzima alcalasa (Al)

En la Figura 10 se muestran los resultados de AAH, expresada en% de inhibición de la ECA, de los distintos extractos de los hidrolizados de gluten de trigo obtenidos con alcalasa, los cuales inhibieron la actividad de la ECA, con excepción del extracto a pH 4 obtenido del hidrolizado de ITCA 14%. Los valores de Inhibición de ECA de GTT de los extractos se muestran en la Figura 8, ya que tanto los hidrolizados obtenidos con la enzima alcalasa como los obtenidos con la enzima Acidasa partieron de la misma muestra de gluten de trigo.

El ANOVA multifactor que relaciona el grado de hidrólisis de los extractos con el % de inhibición de la ECA (Tabla 10) mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) con el grado de hidrólisis, siendo los extractos de ITCA 22% y 32.6% los que presentaron mayor % de inhibición de dicha enzima.

Factor GH	Media	Grupos homogéneos*
14,0%	26 ± 5	a
22,0%	58 ± 5	b
32.6%	59 ± 5	b

Tabla 10. ANOVA Multifactor para el% de inhibición de la ECA según el factor grado de hidrólisis (GH) a diferentes valores de pH de extracción. * Letras diferentes implican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$)

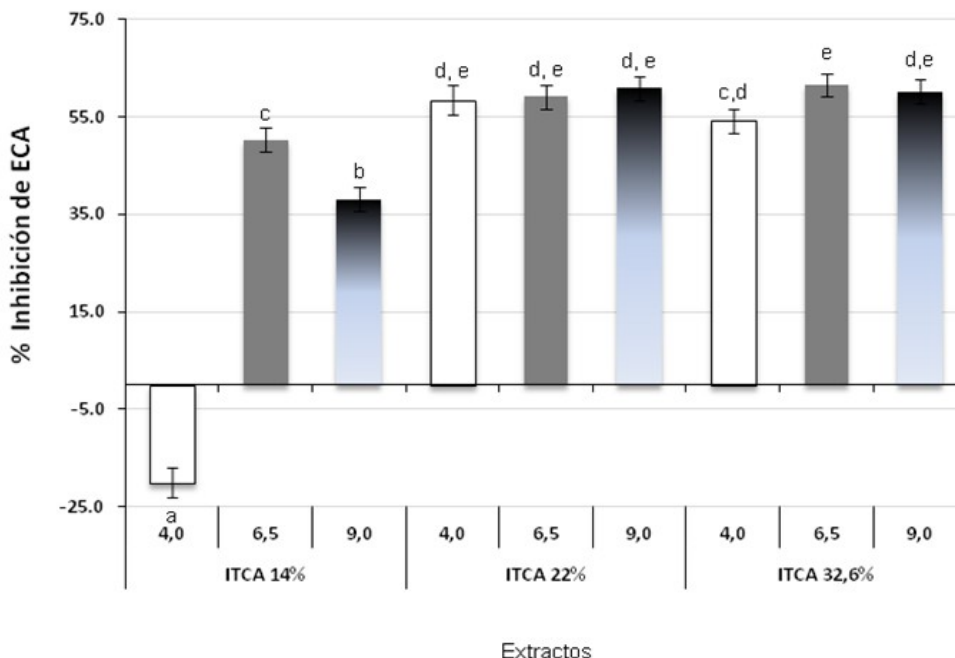


Figura 10. Inhibición de la ECA (%) de los extractos de los hidrolizados de gluten obtenidos con alcalasa de ITCA: 14, 22 y 32.6%. Letras diferentes implican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$)

Evaluando el efecto del pH de extracción sobre el% de inhibición de la ECA (Tabla 11), se encontró un efecto significativo del pH, siendo los extractos de pH 6.5 y 9 los que presentaron mayor actividad.

Factor pH	Media	Grupos homogéneos*
4.0	33 ± 5	a
6.5	57 ± 5	b
9.0	53 ± 5	b

Tabla 11. ANOVA Multifactor para el% de inhibición de la ECA según el factor pH de extracción a diferentes grados de hidrólisis. *Letras diferentes implican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$)

De estos tratamientos, se seleccionó el extracto de pH 6.5 del hidrolizado de ITCA 32.6% para realizar la determinación de la concentración de la IC_{50} (concentración que inhibe el 50% de la actividad de la ECA).

En la Figura 11 se pueden observar los valores del% de inhibición de la ECA con respecto al LOG de las distintas concentraciones del extracto a pH 6.5 del hidrolizado de alcalasa de ITCA 32.6%.

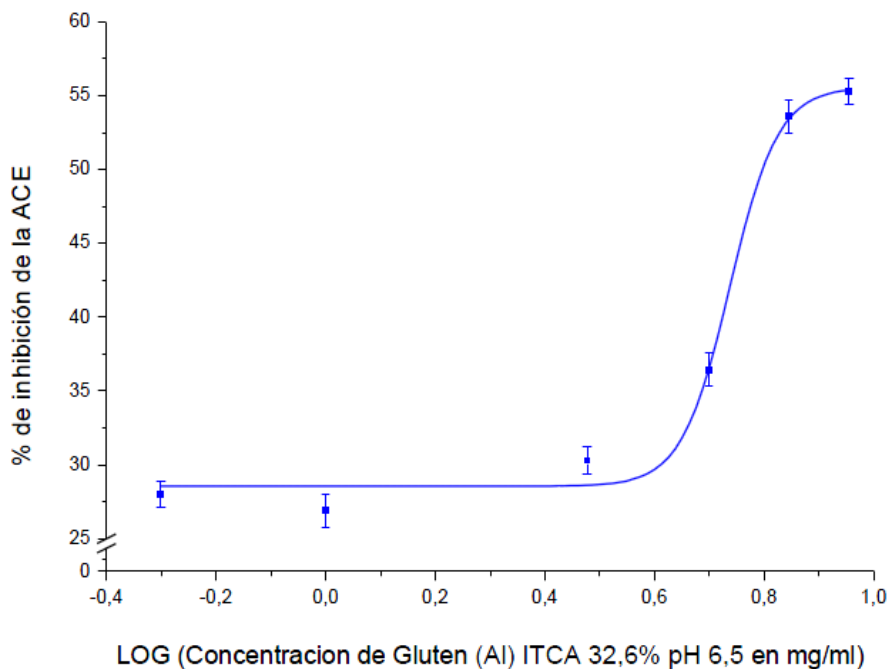


Figura 11. Inhibición de la ECA (%) vs. LOG de la concentración de proteínas en mg/ml del extracto de pH 6.5 del hidrolizado de ITCA 32.6% de alcalasa

En la Tabla 12 se muestran los valores obtenidos para los coeficientes de ajuste de los datos experimentales para el cálculo de la IC₅₀.

Ecuación	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)*p)})$	
R²ajustado	0,98221	
	Valor	Error Estandar
A1	28	1
A2	56	2
LOGx0	0.74	0.02
p	10	4
IC ₅₀	5.5	

Tabla 12. Valores de ajuste de datos experimentales con la función DoseResp

La IC₅₀ obtenida para el extracto a pH 6.5 del hidrolizado de gluten con alcalasa de ITCA 32.6% fue de 5.5 mg/ ml.

En resumen, la hidrólisis del gluten de trigo permitió obtener productos con propiedades AH, obteniéndose los mejores valores de inhibición de la ECA para los extractos obtenidos a partir de las muestras con mayores grados de hidrólisis. El fraccionamiento por pH permitió concentrar la

actividad en las muestras hidrolizadas, obteniéndose mayor actividad en las fracciones de pH 6.5 y pH 9.

Comparación de la AAH de hidrolizados de gluten de trigo obtenidos con distintas enzimas

Considerando las muestras en las que se evaluó la IC_{50} se puede observar en la Figura 12 que el hidrolizado de gluten de trigo obtenido con la enzima Ac alcanzó valores de AAH superiores a los obtenidos por el hidrolizado de gluten de trigo obtenido con la enzima Al (aproximadamente un 29% más). Un dato interesante es que a pesar de ser los perfiles de las curvas muy diferentes para estos extractos, ambos alcanzaron sus respectivos valores de saturación a la misma concentración de proteína (aprox. 7.9 mg/ ml). A diferencia de lo observado para la AAO, la fracción proteica obtenida con la enzima Ac fue la que presentó la mejor IC_{50} .

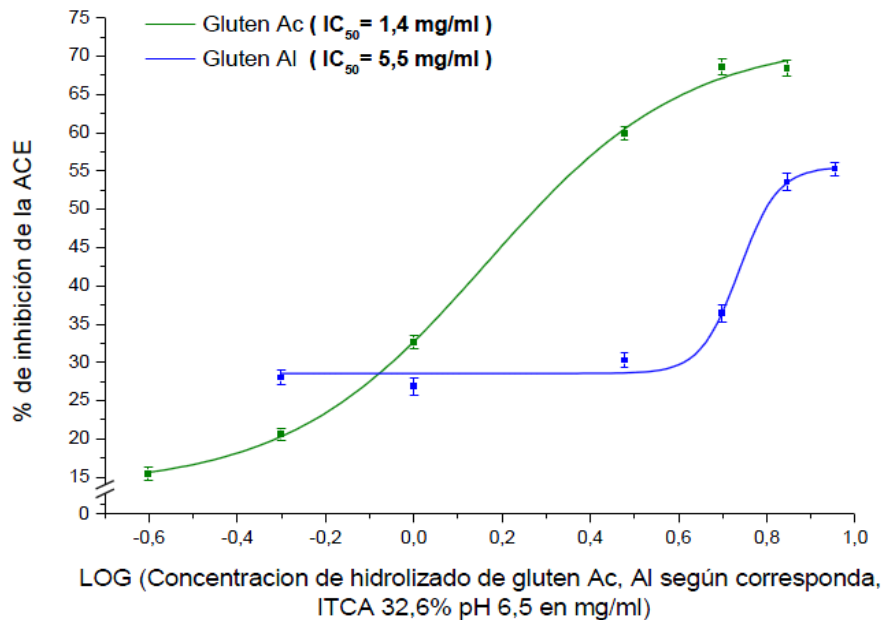


Figura 12. Inhibición de la ECA (%) vs. LOG de la concentración de proteínas de los extractos de pH 6.5 de hidrolizados de gluten de trigo de ITCA 32.6% obtenidos con las enzimas Al y Ac

Li, Le, Liu y Shi (2005) han observado que los hidrolizados enzimáticos de proteínas presentan propiedades de inhibición de la ECA con valores de IC_{50} que abarcan un rango de 0.20 hasta 246.7 mg/ ml. En el presente estudio, los valores obtenidos de IC_{50} fueron de 1.4 y 5.5 mg/ml para los extractos a pH 6.5 de los hidrolizados de gluten de trigo de ITCA 32.6% obtenidos con las enzimas Ac y Al, respectivamente, y se encuentran en el rango de concentración que pueden mediar un efecto antihipertensivo. Similarmente, Castillo, Ferrigno, Acampa, Borrellib, Olano, Martínez-Rodríguez et al. (2007) observaron valores de IC_{50} entre 1.4 y 14 mg/ml para hidrolizados de gluten con distintos tratamientos térmicos y glicosilación. Sin embargo, Saiga, Kanda, Wei, Okumura, Kaneko y Nishimura (2002) hidrolizaron gluten comercial con tripsina, quimotripsina, papaina y actinasa durante 24 h y obtuvieron hidrolizados con valores de IC_{50} de

0.31, 0.42, 0.04 y 0.03 mg/ml, respectivamente, de mayor AAH que los obtenidos en este trabajo.

Como se ha mencionado previamente, el perfil de aminoácidos de los péptidos es importante para que sean inhibidores de la ECA. En este sentido, además de la fuente de proteínas, la especificidad de la proteasa es otro factor importante a considerar para preparar péptidos específicos con diversas funciones nutraceuticas.

La alcalasa es una proteasa alcalina de origen bacteriano para uso industrial, que hidroliza los enlaces peptídicos con amplia especificidad liberando péptidos con aminoácidos hidrofóbicos como Phe, Tyr, Trp, Leu, Ile, Val y Met en su C-terminal (Markland & Smith, 1971). En este sentido, la proteasa alcalasa es apta para la producción de péptidos inhibidores de la ECA, y el gluten de trigo una buena fuente de proteínas para obtener estos péptidos bioactivos de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio.

La acidasa es una enzima de origen fúngico y de grado alimentario, que de acuerdo al fabricante es una mezcla de endo y exoproteasas.

El uso de enzimas comerciales de origen microbiano es en general ventajosa por su bajo costo de producción industrial, en comparación con las de origen animal o vegetal como la pepsina, la tripsina y la papaína, que también se utilizan para la preparación de los péptidos inhibidores de la ECA a partir de proteínas (Mullally, Meisel & FitzGerald, 1997; Arihara, Nakashima, Mukai, Iahikawa & Itoh, 2001; Katayama, Fuchu, Skata, Kawahara, Yamauchi, Kawamura et al., 2003).

La eficacia del fraccionamiento por pH para obtener fracciones con propiedades bioactivas concentradas dependió además del pH utilizado, del hidrolizado (enzima empleada) y del GH alcanzado ya que estos factores determinan la naturaleza de los péptidos obtenidos.

5. Conclusiones

Se obtuvieron resultados interesantes respecto de propiedades bioactivas de hidrolizados, identificándose las enzimas más apropiadas, los grados de hidrólisis y las condiciones de fraccionamiento para obtener mezclas de péptidos con buenas propiedades antioxidantes y antihipertensivas.

Los hidrolizados de gluten de trigo obtenidos con la enzima Acidasa presentaron en general, valores de inhibición de ECA superiores a los obtenidos con la enzima Alcala. La eficacia del fraccionamiento por pH para obtener extractos con propiedades inhibidoras de ECA y antioxidantes concentradas dependió además del pH utilizado, de la enzima utilizada y del GH alcanzado, factores determinantes de la naturaleza de los péptidos obtenidos.

En este trabajo se puso en evidencia las propiedades antioxidantes de compuestos que podrían ser utilizados como aditivos en la conservación de alimentos.

Respecto a los efectos antioxidantes e inhibidores de ECA, si bien se deberían confirmar con evaluaciones *in vivo*, estos estudios dan una indicación de propiedades bioactivas de hidrolizados

de gluten de trigo, que podrían incrementar el valor de subproductos de la industria alimentaria y podrían emplearse en la elaboración de nuevos alimentos funcionales.

Agradecimientos

Investigación financiada por CAI+D 2009 Tipo II PI -54-258.

Referencias

- Arihara, K., Nakashima, Y., Mukai, T., Iahikawa, T., & Itoh, M. (2001). Peptide inhibitors for angiotensin I converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Sci.*, 57, 319–324. [http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00108-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00108-X)
- Calvo Rebollar, M. (1991). *Aditivos Alimentarios. Propiedades, aplicaciones y efectos sobre la salud*. Mira Editores, Zaragoza, España.
- Castillo, M.D. del, Ferrigno, A., Acampa, I., Borrellib, R.C., Olano, A., Martínez-Rodríguez, A., & Fogliano, V. (2007). In vitro release of angiotensin-converting enzyme inhibitors, peroxy-radical scavengers and antibacterial compounds by enzymatic hydrolysis of glycated gluten. *J. Cereal Sci.*, 45, 327-334. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2006.09.005>
- Chang, C.Y., Wu, K.C., & Chiang, S.H. (2007). Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. *Food Chem.*, 100, 1537-1543. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.019>
- Chockalingam, A. (2008). World hypertension day and global awareness. *Can. J. Cardiol.*, 24, 441-444. [http://dx.doi.org/10.1016/S0828-282X\(08\)70617-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0828-282X(08)70617-2)
- Cian, R.E., Drago, S.R., & González, R.J. (2011). Propiedades antioxidantes e inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA I) de fracciones ultrafiltradas de hidrolizados de hemoglobina bovina. *Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay*. LATU, Montevideo. INNOTEC, 6, Dic., 42-46.
- Cui, C., Zhao, H., Zhao, M., & Chai, H. (2011). Effects of extrusion treatment on enzymatic hydrolysis properties of wheat gluten. *J. Food Process Eng.*, 34(2), 187-203. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4530.2008.00348.x>
- Cui, J., Kong, X., Hua, Y., Zhou, H., & Liu, Q. (2011). Continuous hydrolysis of modified wheat gluten in an enzymatic membrane reactor. *J. Sci. Food Agric.*, 91(15), 2799-2805. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.4524>
- Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M., & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chem.*, 19, 144-148. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.039>

Day, L., Augustin, M.A., Batey, I.L., & Wrigley, C.W. (2006) Wheat-gluten uses and industry needs. *Trends Food Sci. Tech.*, 17(2), 82-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.003>

Drago, S.R., González, R.J., & Añón, M.C. (2011). Emulsion properties of different protein fractions from hydrolyzed wheat gluten. En: *Gluten: Properties, Modifications and Dietary Intolerance*. Editors: Diane S. Fellstone. Nova Science publishers, Inc., cap 7, EU, 113-132.

Drago, S.R., & González, R.J. (2001). Foaming properties of enzymatically hydrolysed wheat gluten. *Innov. Food Sci. Emer.*, 1, 269-273. [http://dx.doi.org/10.1016/S1466-8564\(00\)00034-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1466-8564(00)00034-5)

Drago, S.R., González, R.J., & Añón, M.C. (2008a). Application of surface response methodology to optimize hydrolysis of wheat gluten and characterization of selected hydrolysate fractions. *J. Sci. Food Agric.*, 88, 1415-1422. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.3233>

Drago, S.R., González, R.J., & Añón, M.C. (2008b). Techno-functional properties from hydrolyzed wheat gluten fractions. En: *Food Science and Technology: New Research*. Editors: Greco L.V., Bruno M.N. Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY, cap. 10, 355-381.

Fox, P.F., & Flynn, A. (1992). Biological properties of milkprotein. En *Advanced Dairy Chemistry*. Ed. Fox P.F. London: Elsevier Applied Science, 1(Proteins), 255-284.

Hayakari, M., Kondo, Y., & Izumi, H. (1978). A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Anal. Biochem.*, 84, 361-369. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90053-2](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(78)90053-2)

Jin, H.L., Wang, J.S., & Bian, K. (2011). Characteristics of enzymatic hydrolysis of the wheat gluten proteins treated by ultrasound wave. *Adv. Materials Res.*, 343-344, 1015-1022. <http://dx.doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.343-344.1015>

Katayama, K., Fuchu, H., Skata, A., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y., & Muguruma, M. (2003). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of porcine skeletal muscle proteins following enzyme digestion. *Asian-Australian J. Anim. Sci.*, 16, 417-424.

Kong, X., Zhou, H., & Qian, H. (2007a). Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chem.*, 102(3), 759-763. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.062>

Kong, X., Zhou, H., & Qian, H. (2007b). Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chem.*, 102, 759-763. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.062>

Li, G.H., Le, G.W., Liu, H., & Shi, Y.H. (2005). Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin i-converting enzyme inhibitory activity. *Food Sci. Technol. Int.*, 11(4), 281-287. <http://dx.doi.org/10.1177/1082013205056781>

- Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., & Liu, J. (2008). Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chem.*, 106, 444-450. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.067>
- Liao, L., Qiu, C., Liu, T., Zhao, M., Ren, J., & Zhao, H. (2010). Susceptibility of wheat gluten to enzymatic hydrolysis following deamidation with acetic acid and sensory characteristics of the resultant hydrolysates. *J. Cereal. Sci.*, 52, 395-403. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2010.07.001>
- Liao, L., Wang, Q., & Zhao, M.M. (2012). Investigation of the susceptibility of acid-deamidated wheat gluten to in vitro enzymatic hydrolysis using Raman spectra and free amino acid analysis. *J. Sci. Food Agric.*, 92(9), 1865-1873. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.5553>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Majzoobi, M., Abedi, E., Farahnaky, A., & Aminlari, M. (2012). Functional properties of acetylated glutenin and gliadin at varying pH values. *Food Chem.*, 133(4), 1402-1407. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.117>
- Markland, F.S., & Smith, E.L. (1971). Subtilisins: primary structure, chemical and physical properties. En: *The Enzyme*. Boyer, P.D. (ed.), New York: Academic Press, 561-608.
- Mimouni, B., Raymond, J., Merle-Desnoyers, A.M., Azanza, J.L., & Ducastaing, A. (1994). Combined acid deamidation and enzymic hydrolysis for improvement of the functional properties of wheat gluten. *J. Cereal Sci.*, 20(2), 153-165. <http://dx.doi.org/10.1006/jcrs.1994.1055>
- Mullally, M.M., Meisel, H., & FitzGerald, R.J. (1997). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *Int. Dairy J.*, 7, 299-303. [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(97\)00018-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(97)00018-6)
- Nordqvista, P., Lawtherb, M., Malmströma, E., & Khabbazc, F. (2012). Adhesive properties of wheat gluten after enzymatic hydrolysis or heat treatment – A comparative study. *Ind. Crop Prod.*, 38, 139-145. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.01.021>
- Pecquet, C., & Lauriere, M. (2003). New allergens in hydrolysates of wheat proteins. *Rev. Fr. Allergol.*, 43, 21-23.
- Popineau, Y., Huchet, B., Larré, C., & Bérot, S. (2002). Foaming and emulsifying properties of fractions of gluten peptides obtained by limited enzymic hydrolysis and ultrafiltration. *J. Cereal Sci.*, 35, 327-335. <http://dx.doi.org/10.1006/jcrs.2001.0437>
- Pukalskas, A., van Beek, T.A., Venskutonis, R.P., Linssen, J.P., van Veldhuizen, A., & de Groot, A. (2002). Identification of radical scavengers in sweet grass (*Hierochloa odorata*). *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2914-2919. <http://dx.doi.org/10.1021/jf011016r>

Saiga, A.I., Kanda, K., Wei, Z., Okumura, T., Kaneko, T., & Nishimura, T. (2002). Hypotensive activity of muscle protein and gluten hydrolysates obtained by protease treatment. *J. Food Biochem.*, 26(5), 391-401. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4514.2002.tb00761.x>

Tirelli, A., De Noni, I., & Resmini, P. (1997). Bioactive peptides in milk products. *Ital. J. Food Sci.*, 2, 91-98.

Torruco-Uco, J.G., Domínguez-Magaña, M.A., Dávila-Ortíz, G., Martínez-Ayala, A., Chel-Guerrero, L.A., & Betancur-Ancona, D.A. (2008). Antihypertensive peptides for treatment of natural origin: A review. *Ciencia Tecnol. Alime.*, 6, 158-168.

Vermeirssen, V., Van Camp, J., & Verstraete, W. (2002). Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *J. Biochem. Bioph. Meth.*, 51, 75-87. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-022X\(02\)00006-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-022X(02)00006-4)

Wang, J., Wei, Z., Li, L., Bian, K., & Zhao, M. (2009). Characteristics of enzymatic hydrolysis of thermal-treated wheat gluten. *J. Cereal Sci.*, 50(2), 205-209. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2009.05.004>

Wang, J., Zhao, M., Yang, X., & Jiang, Y. (2006). Improvement on functional properties of wheat gluten by enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. *J. Cereal Sci.*, 44(1), 93-100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2006.04.002>

Wang, J., Zhao, M., Zhao, Q., & Jiang, Y. (2007). Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. *Food Chem.*, 101, 1658-1663. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.024>

Wang, X.S., Tang, C.H., Chen, L., & Yang, X.Q. (2009). Antioxidant properties of hemp protein hydrolysates. *Food Technol. Biotech.*, 47(4), 428-434.

Zhang, H., Claver, I.P., Li, Q., Zhu, K., Peng, W., & Zhou, H. (2012). Structural modification of wheat gluten by dry heat-enhanced enzymatic hydrolysis. *Food Technol. Biotech.*, 50(1), 53-58.

Zhang, H.H., Li, Q., Claver, I.P., Zhu, K.X., Peng, W., & Zhou, H.M. (2010). Effect of cysteine on structural, rheological properties and solubility of wheat gluten by enzymatic hydrolysis. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 45(10), 2155-2161. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02384.x>

Zhu, K., Zhou, H., & Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with Alcalase. *Process Biochem.*, 41, 1296-1302. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2005.12.029>

Zhu, K.X., Su, C.Y., Guo, X.N., Peng, W., & Zhou, H.M. (2011). Influence of ultrasound during wheat gluten hydrolysis on the antioxidant activities of the resulting hydrolysate. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 46(5), 1053-1059. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02585.x>

Żukowska, E.A., Rudnik, E., & Kijeński, J. (2008). Foaming properties of gluten and acetylated gluten: Studies of the mathematical models to describe liquid drainage. *J. Cereal Sci.*, 47(2), 233-238. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2007.04.005>

Abreviaturas utilizadas

AAH: actividad anti-hipertensiva

AAO: actividad antioxidante

Ac: encima acidasa

Al: enzima alcalasa

AO: antioxidante

ECA: enzima convertidora de angiotensina I

GH: grado de hidrólisis

GTT: gluten de trigo tratado térmicamente

IC₅₀: 50% de inhibición de la actividad

ITCA: índice de tricloroacético

TEAC: capacidad antioxidante Trolox equivalente