



REVISIÓN

## Péptidos bioactivos

Juana Mulero Cánovas<sup>a,\*</sup>, Pilar Zafrilla Rentero<sup>a</sup>, Adela Martínez-Cachá Martínez<sup>a</sup>, Mariano Leal Hernández<sup>b</sup> y José Abellán Alemán<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición, Universidad Católica de Murcia (UCAM), Murcia, España

<sup>b</sup> Cátedra de Riesgo Cardiovascular, Universidad Católica de Murcia (UCAM), Murcia, España

Recibido el 25 de marzo de 2011; aceptado el 14 de abril de 2011

Disponible en Internet el 30 de julio de 2011

### PALABRAS CLAVE

Péptidos bioactivos;  
Hipocolesterolmia;  
Fuentes alimentarias

**Resumen** Los péptidos bioactivos o péptidos con actividad biológica producidos durante la digestión gastrointestinal o la elaboración de alimentos pueden ejercer un importante papel en la regulación y la modulación metabólica, que sugiere su uso potencial como nutracéuticos e ingredientes de alimentos funcionales para promoción de la salud y la reducción del riesgo de enfermedad. En los últimos años se han destinado muchos esfuerzos al estudio de las diferentes actividades beneficiosas que estos péptidos bioactivos pueden tener sobre el organismo, incluyendo su actividad antihipertensiva, hipocolesterolmiante, antioxidante, antimicrobiana e inmunomoduladora, así como su efecto opioáceo. Así mismo se están destinando esfuerzos en investigación para la detección de fuentes alimentarias de péptidos bioactivos así como al estudio de su biodisponibilidad, de sus propiedades funcionales y de sus mecanismos de acción.

© 2011 Elsevier España, S.L. y SEA. Todos los derechos reservados.

### KEYWORDS

Bioactive peptides;  
Hypocholesterolemic;  
Food sources

### Bioactive peptides

**Abstract** Bioactive peptides, or peptides with biological activity produced during gastrointestinal digestion or food processing, could play an important role in metabolic regulation and modulation, suggesting their potential use as nutraceuticals and ingredients of functional foods to promote health and reduce the risk of disease. In the last few years, efforts have been made to study the various potential beneficial activities of these bioactive peptides in the body, including their antihypertensive, hypocholesterolemic, antioxidant, antimicrobial, immunomodulatory, and opiate-like activities. Likewise, research is currently being carried out to detect food sources of bioactive peptides as well as to study their bioavailability, functional properties and mechanisms of action.

© 2011 Elsevier España, S.L. and SEA. All rights reserved.

### Introducción. Péptidos bioactivos

Las proteínas que tomamos a través de la dieta nos aportan los aminoácidos necesarios para el desarrollo y el mantenimiento de las células y los tejidos de nuestro organismo.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [\(J. Mulero Cánovas\).](mailto:joseabellan@pdi.ucam.edu)

En la actualidad, las proteínas alimentarias se investigan no sólo desde el punto de vista nutricional o funcional, sino como materia prima para la obtención de péptidos<sup>1</sup>, ya que toda fuente de proteínas alimentarias es susceptible de aportar péptidos funcionales. Sin embargo, hemos de ser críticos en cuanto a su utilización, pese a que en algunos casos su funcionalidad no es algo novedoso, puesto que la existencia de proteínas en la leche materna que contribuyen a la maduración y la función del sistema inmune en el neonato es un hecho conocido desde hace más de 50 años<sup>2-4</sup>.

Estos péptidos funcionales o bioactivos se definen como secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora, que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación mediante hidrólisis química o enzimática<sup>5</sup>. Generalmente, son péptidos de pequeño tamaño, de 3 a 20 aminoácidos, aunque en algunas ocasiones pueden exceder esta longitud, que son liberados durante el procesado industrial de los alimentos, o bien durante la digestión gastrointestinal<sup>6,7</sup>. Tras la administración oral, los péptidos bioactivos pueden ejercer su efecto, entre otros, sobre los sistemas cardiovascular, digestivo, inmunológico y nervioso<sup>8,9</sup>. La literatura científica evidencia que estos péptidos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, pudiendo ejercer funciones específicas a nivel local, en el tracto gastrointestinal y a nivel sistémico. Dentro de estas actividades, los péptidos bioactivos podrían influir en el metabolismo celular y actuar como vasorreguladores, factores de crecimiento, inductores hormonales y neurotransmisores<sup>10</sup>.

## Péptidos bioactivos en alimentos

Como se ha comentado anteriormente, los péptidos bioactivos no son más que una pequeña secuencia de aminoácidos encriptados en proteínas; cabe por tanto esperar, debido a la amplia gama de alimentos proteicos existentes en la naturaleza y sobre todo en el mercado, que su ingesta esté asegurada con una alimentación equilibrada. Sin embargo, su biodisponibilidad no está tan clara, ya que han de ser liberados de las proteínas en las que se encuentran tras sufrir la acción de las proteasas gástricas e intestinales y han de poder atravesar el epitelio intestinal y llegar a los tejidos periféricos a través de la circulación sanguínea para poder ejercer su acción<sup>9-13</sup>.

En los últimos años, debido a la gran relevancia que estos péptidos han obtenido en el mercado, se han desarrollado técnicas para la obtención de nuevos péptidos bioactivos a partir de proteínas alimentarias mediante digestión enzimática *in vitro*, empleando enzimas proteolíticas de origen microbiano<sup>12</sup>. Es más, en estudios recientes se han obtenido péptidos modificados, diseñados a partir de péptidos naturales, con el fin de incrementar la actividad de estos últimos<sup>14</sup>.

De esta manera, proteínas de distinta procedencia (animal y vegetal) han sido utilizadas para el aislamiento de péptidos a partir de hidrolizados enzimáticos<sup>9,15,16</sup>, siendo interesante destacar que dependiendo de la fuente proteica, del tipo de enzima usado y de las condiciones de procesado, la actividad biológica y los péptidos obtenidos es distinta<sup>17</sup>. Entre las proteínas de origen vegetal de las que se han aislado péptidos bioactivos encontramos las

proteínas de soja, de trigo, de maíz, de arroz, de cebada y de girasol<sup>17</sup>. En cuanto a las proteínas de origen animal, la leche y otros productos lácteos son los precursores de los péptidos bioactivos más estudiados, aunque también se han identificado estos péptidos en la ovoalbúmina de huevo<sup>9</sup>, en la carne<sup>9</sup>, en el músculo de pescado (sardina, atún, bonito)<sup>18</sup> y en la jalea real<sup>19</sup>.

## Propiedades beneficiosas de los péptidos bioactivos

### Propiedades antimicrobianas e inmunomodulantes

La asociación entre la nutrición y la inmunidad es un hecho reconocido desde hace tiempo. Existen estudios que demuestran que péptidos bioactivos derivados de diferentes fuentes de proteínas ejercen efectos inmunomoduladores *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, la mayoría de los estudios se centran en la evaluación del efecto de los péptidos hidrolizados de proteínas específicas en el sistema inmunológico y sólo un número limitado de investigaciones examinan su impacto en la inmunidad inespecífica (innata). Los péptidos inmunomoduladores son liberados de las proteínas que los contienen de manera natural durante el proceso de la digestión en el tracto gastrointestinal, lo que afecta a la respuesta inmunológica y a la función celular en el mismo.

Los péptidos bioactivos con propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras más estudiados son aquellos que proceden de la leche y los productos lácteos<sup>20</sup>. Este efecto parece estar relacionado con la carga neta positiva de estos péptidos, que se organizan estructuralmente y provocan la formación de canales iónicos en la membrana de los microorganismos<sup>21</sup>, alterando su permeabilidad y provocando la muerte celular<sup>22</sup>.

En la leche y también en el huevo se encuentran la lactotransferrina y la ovotransferrina. Ambas transferrinas poseen actividad antibacteriana frente a gran variedad de microorganismos. Esta actividad puede ser ejercida al menos mediante tres mecanismos distintos<sup>23-25</sup>:

- Secuestrando el hierro e impidiendo su utilización por las bacterias.
- Produciendo alteraciones en la pared bacteriana.
- Mediante la estimulación de la fagocitosis por macrófagos y monocitos.

Los péptidos bioactivos con actividad antimicrobiana ejercen un efecto inhibidor sobre los microorganismos de destino también mediante la interacción con los componentes intracelulares aniónicos como el ADN y el ARN, lo que inhibe la síntesis de proteínas y la división celular de los microorganismos. Por otra parte, algunos péptidos están involucrados en la activación autolítica en los microorganismos diana<sup>26</sup>.

Péptidos derivados de las caseínas de la leche muestran también actividad antimicrobiana *in vitro* frente a una amplio rango de microorganismos, entre los que se incluyen *Staphylococcus* spp y *Streptococcus pyogenes*. Estudios *in vivo* muestran efectos protectores de la israicina (derivado de la caseína) frente a *S. aureus* y *Candida albicans* en ratones y frente a mastitis en vacas y ovejas<sup>27,28</sup>.

También se ha descrito que la lactoferrina es capaz de inhibir la replicación de virus como el de la leucemia de células T del tipo I, el citomegalovirus, el virus de la hepatitis C o el herpes simple tipo I<sup>14</sup>.

La lisozima, presente también en la leche y el huevo, posee actividad antimicrobiana e inmunorreguladora, pudiendo mejorar la sinusitis crónica y normalizar la respuesta humoral y celular en pacientes con bronquitis crónica cuando se combina con inmunoterapia. Además, mejora la respuesta inmune en pacientes cancerosos inmunoedimidos. Se ha sugerido que la inmunomodulación producida por la lisozima puede ser resultado de la estimulación de la función fagocítica y de la hidrólisis de productos de peptidoglucano que pueden actuar como adyuvantes o inmunomoduladores<sup>25,29-31</sup>.

Otros alimentos, aunque no tan estudiados como los lácteos, también contienen péptidos con actividad inmuno-modulante, como es el caso de la jalea real de la que se han aislado péptidos que estimulan la proliferación de monocitos humanos<sup>32</sup>, péptidos derivados de las proteínas del arroz y la soja que estimulan los sistemas de inmunidad no específica<sup>33</sup> y péptidos del trigo sarraceno y pimiento<sup>34,35</sup>.

## Actividad opiácea

Los péptidos con actividad opiácea, también llamados exorfinas, se definen como péptidos que presentan afinidad por receptores opiáceos y actúan, mediante la unión a receptores, como moduladores exógenos de la motilidad intestinal, de la permeabilidad epitelial y de la liberación de hormonas. Estos péptidos han sido aislados de cereales, leches y tejidos animales<sup>11</sup>.

La péptidos opioides más estudiados son los derivados de proteínas lácteas (caseínas)<sup>11,14</sup>. Una vez absorbidos, estos péptidos pueden viajar al cerebro y otros órganos y ejercer actividades farmacológicas similares a la morfina o el opio. Éste puede ser el motivo por el cual los recién nacidos humanos, en general, se calman y tienen sueño después de beber leche. En contraste con las casomorfinas, algunos péptidos producidos por el desglose de  $\kappa$ -caseína pueden actuar como antagonistas de los opioides, es decir, que pueden inhibir el efecto de sustancias como la morfina<sup>36</sup>.

En los seres humanos adultos, los efectos de estos péptidos suelen limitarse al tracto gastrointestinal, ya que, o bien no son absorbidos, o escapan a la degradación enzimática en la pared intestinal<sup>37</sup>. Sin embargo, existen estudios que sugieren que algunos de ellos ( $\beta$ -casomorfinas) pueden ser transportados de la sangre al tronco cerebral<sup>38</sup> y al sistema cardiovascular en los lactantes<sup>37</sup>.

Los péptidos lácteos pueden participar en la regulación del apetito, modificando la actividad endocrina del páncreas para aumentar la producción de insulina<sup>39</sup>. Estudios en ratas indican que las  $\beta$ -casomorfinas pueden modular la ingesta, estimulando la ingesta de grasa y reduciendo la ingesta de dietas ricas en hidratos de carbono<sup>40</sup>. En este sentido, también algunos péptidos derivados del gluten de trigo administrados por vía intravenosa y oral en ratas dio lugar a la estimulación postprandial de la liberación de insulina<sup>41</sup>.

Parte de la función de las casomorfinas podría ser la reducción de la motilidad intestinal, lo que permitiría la máxima producción de otros péptidos bioactivos<sup>42</sup>. En

humanos adultos se han detectado fragmentos opiáceos en el contenido intestinal tras la ingestión de leche de vaca<sup>43</sup>, no detectándose, sin embargo, en el suero sanguíneo. La confirmación en el hombre de los efectos detectados en los animales de experimentación abriría un nuevo campo de aplicación de estos péptidos opiáceos en la prevención y el tratamiento de trastornos intestinales.

## Actividad antioxidante

Los antioxidantes no sólo son importantes en la prevención de la oxidación en los alimentos, sino también a nivel fisiológico. Los radicales libres son unas moléculas que están en continua formación en las células y que son neutralizados de manera natural por las defensas antioxidantes del organismo. Sin embargo, existen factores que producen un desequilibrio en el número de radicales libres, y un exceso de éstos puede dar lugar a un envejecimiento celular o al desarrollo de enfermedades<sup>44</sup>. Todo esto ha llevado a la búsqueda de compuestos antioxidantes naturales para la prevención de la oxidación por parte de los radicales libres.

El estudio de péptidos antioxidantes presentes en alimentos ha sido un reto en los últimos años, habiéndose identificado numerosos péptidos que presentan actividad antioxidante en diferentes alimentos<sup>45,46</sup> y en derivados de ellos, como hidrolizados de gelatina<sup>47</sup>, hidrolizados de clara de huevo<sup>48</sup> y productos lácteos<sup>49</sup>, entre otros. Estos péptidos actúan impidiendo que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los radicales libres que con el resto de las moléculas presentes en un determinado microambiente de membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular<sup>50</sup>.

## Actividad antihipercolesterolémica

La hiperlipidemia, en especial la hipercolesterolemia, es uno de los más importantes factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Recientemente se ha demostrado que los péptidos de la soja pueden ser responsables, al menos en parte, de su actividad hipocolesterolémica, ya que se ha observado que hidrolizados de proteína de soja mostraron un mayor descenso del colesterol plasmático que la proteína de soja intacta<sup>51</sup>.

Este efecto hipocolesterolémico de los péptidos bioactivos se atribuye a dos acciones de los mismos:

- Los péptidos bioactivos inhiben la absorción del colesterol, posiblemente debido a la represión de la solubilidad micelar del colesterol<sup>52</sup>.
- Algunos péptidos pueden regular al alza los receptores LDL, que están crónicamente suprimidos por la hipercolesterolemia o administración de colesterol de la dieta<sup>53</sup>.

Además de los péptidos derivados de la soja, otros péptidos bioactivos con efecto hipocolesterolémico han sido obtenidos a partir de *B-Lactoglobulina*, hidrolizado de proteína de carne de cerdo<sup>54,55</sup> y proteína vegetal (*Brassica carinata*)<sup>56</sup>.

## Péptidos con actividad sobre el sistema cardiovascular

Los principales efectos descritos de los péptidos bioactivos sobre el sistema cardiovascular son los relativos a su actividad antitrombótica y antihipertensiva.

### Actividad antitrombótica

La agregación plaquetaria es un paso crítico en la formación de trombos y está mediada por el enlace del fibrinógeno y su receptor, la glucoproteína GPIIb/IIIa de la membrana de las plaquetas, la cual involucra el reconocimiento de la secuencia Arg-Gli-Asp (RGD) del fibrinógeno. Es concebible, por lo tanto, que los péptidos que contienen la secuencia RGD puedan ser capaces de antagonizar el acoplamiento del fibrinógeno a la GPIIb/IIIa, resultando en la inhibición de la agregación de plaquetas. En la secuencia RGD, una unidad catiónica, en este caso el grupo guanidino de la cadena lateral de la Arg y la estructura del ácido  $\beta$ -carboxílico de la Asp, es requerida para la actividad inhibitoria. Además, la distancia entre estos grupos funcionales catiónicos y aniónicos es un factor importante en potencia. El fibrinógeno enlaza sitios de la GPIIb/IIIa, la cual tiene un número de residuos de Asp, y a causa de esto el grupo guanidino de la Arg, en el caso de compuesto tipo-RGD, se piensa que puede estar involucrado en la ligadura iónica con el grupo carboxilato del Asp en la GPIIb/IIIa<sup>57</sup>. Por lo anterior, los péptidos que son antagonistas del fibrinógeno y se fijan a GPIIb/IIIa son útiles en la prevención de la trombosis y en los regímenes de tratamiento post-angioplastia o post-trombolíticos.

Los principales péptidos aislados con actividad antitrombótica se encuentran presentes en la leche. A nivel molecular, la coagulación de la sangre y de la leche muestra gran similitud. En la leche, el mecanismo de coagulación es definido por la interacción de la  $\kappa$ -caseína con quimosina, y el proceso de coagulación de la sangre es definido por la interacción del fibrinógeno con trombina.

Determinadas secuencias peptídicas de la  $\kappa$ -CN, denominadas casoplatelinas, son similares a la cadena  $\gamma$  del fibrinógeno<sup>58</sup>. Se ha comprobado *in vitro* que los péptidos derivados de la  $\kappa$ -CN bovina son inhibidores de la agregación plaquetaria y de la unión de la cadena  $\gamma$  del fibrinógeno humano al receptor específico de la membrana de las plaquetas<sup>59</sup>. Estos péptidos son capaces de fijarse sobre receptores específicos situados en la superficie de las plaquetas, impidiendo así la formación del trombo.

Péptidos derivados de la lactoferrina presentan también actividad antitrombótica a través de otro mecanismo distinto al de la caseína, inhibiendo, de manera dosis-dependiente, la agregación plaquetaria inducida por ADP, debido a la homología con el fragmento f(572-575) de la cadena  $\alpha$  del fibrinógeno<sup>60</sup>. Se ha comprobado *in vivo* que este fragmento inhibe la formación de trombos en la arteria coronaria de perros<sup>61</sup> y prolonga el tiempo de sangrado en la arteria mesentérica del hámster<sup>62</sup>.

En el plasma de recién nacidos alimentados con leche materna o con fórmulas infantiles elaboradas con leche de vaca se han encontrado secuencias peptídicas en concentración suficiente para ejercer el efecto antitrombótico *in vivo*, lo que demuestra su liberación a partir de las proteínas lácteas durante el proceso de digestión gastrointestinal<sup>63</sup>.

Estudios más recientes han demostrado la presencia de péptidos antitrombóticos en el estómago, duodeno y posteriormente en la sangre de adultos que habían ingerido leche o yogur<sup>63</sup>.

### Actividad antihipertensiva

La hipertensión es la principal causa de enfermedad en los países industrializados. El 35% de la mortalidad en estos países se debe a esta enfermedad o a alguna de sus complicaciones renales, cardíacas o cerebrales. Debido a esto, los alimentos que presentan péptidos con actividad antihipertensiva son de gran interés.

El mecanismo antihipertensivo más estudiado como actividad de los péptidos bioactivos es la inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La ECA es una enzima que cataliza la conversión de la angiotensina I (decápепtido) en angiotensina II (octapéptido).

La angiotensina II es un compuesto de elevada potencia vasoconstrictora. Su acción provoca la contracción rápida de las arteriolas y, por tanto, el incremento de la presión arterial, ya que estimula la secreción de aldosterona por las glándulas suprarrenales, hormona que induce la excreción de potasio y la retención de sodio y agua y provoca el incremento del volumen extracelular, y la neutralización de la producción de renina. La renina libera el decápепtido angiotensina I del sistema renina-angiotensina. Este sistema es, quizás, el más importante de los diferentes mecanismos vasoconstrictores y vasodilatadores implicados en la regulación de la presión sanguínea<sup>64</sup>.

La ECA actúa simultáneamente en el sistema cininocalicreína catalizando la degradación de las bradicininas, compuestos de potente acción vasodilatadora, y de esta manera se favorece el incremento de la presión arterial. El incremento de la disponibilidad de bradicininas debido a la inhibición de la ECA puede ser parcialmente responsable del efecto beneficioso de la inhibición de la ECA sobre la presión sanguínea.

Algunos trabajos se han centrado en la producción y el aislamiento de péptidos inhibidores de la ECA, procedentes de proteínas de diferentes alimentos<sup>65-67</sup>. Algunos autores han encontrado que, en productos fermentados, péptidos con actividad inhibitoria de la ECA podrían, también, presentar actividad antioxidante, sugiriendo la presencia de actividad multifuncional en estos compuestos<sup>68,69</sup>. Se han buscado inhibidores competitivos exógenos de esta enzima, a partir de distintas fuentes (pescado, maíz, gelatina, veneno de serpiente, vino, etc.). El origen de estas fuentes proteicas engloba tanto al reino vegetal como al reino animal. Los inhibidores competitivos compiten con el sustrato por el centro activo de la enzima. En este caso, el aumento en la concentración del sustrato da lugar a una disminución de la capacidad del inhibidor para competir con éste. Por otra parte, los inhibidores no competitivos se unen a la enzima en una zona diferente al centro activo, deformándolo, de manera que impide el enlace con el sustrato, siendo este tipo de inhibición independiente de la concentración de sustrato. Dependiendo del tipo de inhibidor, se puede producir inhibición competitiva o no competitiva<sup>65</sup>.

Se han identificado varios péptidos endógenos que actúan como inhibidores y sustratos competitivos de la ECA, como las encefalinas, las bradicininas y la sustancia P. Como

Proteína	Fragmento peptídico	ECA IC <sub>50</sub> μmol/l
<i>Casocininas</i>		
α <sub>s1</sub> -caseína	f(25-27)	2,0
α <sub>s2</sub> -caseína	f(174-179)	4,3
β-caseína	f(74-76)	5,0
κ-caseína	f(185-190)	52,0
<i>Lactocininas</i>		
α-lactoalbúmina	f(104-108)	77,0
β-lactoglobulina	f(142-148)	42,6

Fuente: FitzGerald et al<sup>76</sup>

ECA IC<sub>50</sub>: concentración de péptido que inhibe la actividad de la enzima convertidora de angiotensina al 50%.

primeros inhibidores exógenos de la ECA se estudiaron los extractos del veneno de la serpiente *Bothrops jararaca*. Actualmente, un derivado sintético, el captopril (D-3-mercaptopropanoilo-1-prolina; IC<sub>50</sub> = 0,006 μM), obtenido tras el estudio del modelo hipotético del sitio activo de la enzima, es el fármaco más empleado en el control de la hipertensión<sup>70</sup>.

Otra de las enzimas involucradas en la regulación de la presión arterial es la enzima convertidora de endotelina (ECE). Esta enzima cataliza la formación de endotelina-1 a partir de su precursor. La endotelina-1 es un potente vasoconstrictor, lo que favorece el incremento de la presión arterial; por lo tanto, la inhibición de la ECE produce un efecto antihipertensivo. Sólo se han descrito péptidos inhibidores de esta enzima a partir de un hidrolizado digestivo del bonito<sup>71</sup>, pero el alto contenido y la gran variedad de proteínas presentes en la leche podrían abrir un nuevo campo de estudio encaminado a la identificación de péptidos lácteos con esta actividad.

Durante los últimos 20 años, muchos péptidos inhibidores de la ECA con propiedades antihipertensivas *in vivo* se han identificado en alimentos.

**Péptidos inhibidores de ECA en lácteos.** Un gran número de péptidos inhibidores de la ECA se han aislado de productos lácteos (queso, leche, leche fermentada...). Algunos de ellos han mostrado efectos antihipertensivos en animales de experimentación espontáneamente hipertensos y en pacientes con hipertensión. En la tabla 1 se muestra la actividad antihipertensiva de distintas proteínas lácteas.

Maruyama y Suzuki<sup>72</sup> fueron los primeros en aislar un péptido inhibidor de la ECA (llamado CEI 12) a partir de un hidrolizado de caseína (dodecapeptido, IC<sub>50</sub> = 77 μM). Posteriormente, otros péptidos inhibidores de la ECA se han aislado de diferentes productos lácteos, sobre todo de productos lácteos fermentados.

Yamamoto et al<sup>73</sup> han demostrado que las leches fermentadas con *L. helveticus* son las que más actividad inhibitoria de la ECA presentan, debido a la alta actividad proteolítica extracelular de esta cepa. Otros péptidos con actividades inhibitorias se han identificado en leches fermentadas por *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* o *Lactobacillus lactis* sp. *cremoris*<sup>74</sup> y en el kéfir, una leche fermentada preparada a partir de un caldo de cultivo que incluye bacterias acídolácticas, una cepa de *Saccharomyces kefir* y algunas especies bacterias acéticas, aunque en éste la actividad

inhibidora de la ECA es baja<sup>75</sup>. Parece que los péptidos que se encuentran en el kéfir no son las principales sustancias involucradas en sus efectos antihipertensivos.

Los estudios llevados a cabo en quesos han demostrado una fuerte actividad inhibitoria de la ECA observada después de un proceso de digestión proteásica<sup>76</sup>. La proteólisis que tiene lugar durante la maduración de los quesos podría aumentar la tasa de actividad inhibitoria de la ECA a un cierto nivel, más allá del cual esta actividad inhibitoria disminuye<sup>77</sup> debido a que los péptidos bioactivos se transforman en moléculas inactivas y aminoácidos<sup>78</sup>. El momento óptimo de maduración para la producción de péptidos bioactivos es distinto para cada tipo de queso. Como ejemplo, podríamos hablar de 8 meses para un queso tipo manchego<sup>79</sup>.

En la tabla 2<sup>80</sup> aparecen reflejados algunos de los productos que existen en el mercado y que ofrecen alegaciones acerca de la reducción de la presión arterial en humanos, las dosis utilizadas y la presión arterial inicial de los sujetos en los estudios.

**Péptidos derivados de productos marinos.** Algunos péptidos inhibidores de la ECA han sido obtenidos por digestión proteica enzimática a partir de proteína muscular de atún<sup>81</sup>, músculo de sardina<sup>82</sup>, bonito seco<sup>83</sup>, algas<sup>84</sup> y otros productos marinos.

Algunos hidrolizados de proteínas han mostrado efectos *in vitro* (mediante la inhibición de la ECA) e *in vivo* (efectos antihipertensivos) (tabla 3). La administración de un hidrolizado de músculos de bonito a ratas espontáneamente hipertensas ha permitido suprimir la hipertensión después de un periodo de cinco semanas de tratamiento utilizando una dosis de 15 a 60 mg/kg<sup>60</sup>.

Los hidrolizados de algas son también una fuente importante de péptidos biológicamente activos, algunos de los cuales han sido identificados y presentan las actividades inhibitorias de la ECA (tabla 3). Estos resultados pueden explicar en parte los efectos antihipertensivos observados en ratas espontáneamente hipertensas (SHR)<sup>83,85</sup>. Otros péptidos inhibidores de la ECA han sido identificados en hidrolizados de pescado, pero muy pocas han sido evaluadas *in vivo*.

**Productos vegetales.** Se han encontrado péptidos inhibidores de la ECA en muchas fuentes vegetales, como soja<sup>9</sup>, germen de trigo<sup>86</sup> y garbanzo<sup>87</sup>.

En el gluten de trigo se aisló un hexapéptido que mostró una actividad antagonista con respecto a la angiotensina I *in vivo*. Recientemente, un hidrolizado de gluten ha conseguido una reducción de la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas 2 h después de la administración intravenosa<sup>88</sup>.

La hidrólisis de las proteínas de colza reveló que la presencia de péptidos inhibidores de la ECA puede mostrar un efecto antihipertensivo *in vivo*. Este hidrolizado, administrado a ratas SHR, reduce significativamente la presión arterial 2 h después de su administración por vía oral (0,15 g/kg)<sup>89</sup>. También se ha demostrado el efecto antihipertensivo de un régimen de soja cuando se administra en ratas SHR<sup>90</sup>. De la misma manera, la digestión de las principales proteínas de reserva de semillas de garbanzo produce péptidos inhibidores de la ECA<sup>91</sup>.

**Otras fuentes.** Oshima et al<sup>91</sup> fueron los primeros en identificar péptidos inhibidores de la ECA a partir de proteínas de la dieta. En los últimos años se han llevado a cabo estudios

**Tabla 2** Estudios clínicos con productos lácteos y péptidos que presentan un efecto antihipertensivo en humanos

Producto	Componente activo (dosis)	Tensión arterial inicial de los sujetos	Efecto en la presión arterial sistólica
Calpis (leche fermentada)	IPP (1,04 mg)	Hipertensos	-9,4 mmHg (4 semanas)
	VPP (1,42 mg)		-14,1 mmHg (8 semanas)
Calpis (leche fermentada)	IPP (1,15 mg)	Hipertensión media	-4,3 mmHg (2 semanas)
	VPP (1,98 mg)		-5,2 mmHg (4 semanas)
Péptido ameal (hidrolizado de caseínas)	IPP + VPP (1,8 mg)	Presión arterial normal alta	-6,3 mmHg (6 semanas)
	IPP + VPP (2,5 mg)		-6,7 mmHg (6 semanas)
Evolus/Kaiku Vitabrand (leche fermentada)	IPP + VPP (3,6 mg)	Hipertensión moderada	-10,1 mmHg (6 semanas)
	IPP (2,25 mg)	Hipertensión moderada	-14,9 mmHg (8 semanas)
Evolus/Kaiku Vitabrand (leche fermentada)	VPP (3-3,75 mg)		
	IPP (2,25 mg)	Hipertensos	-6,7 mmHg (21 semanas)
Evolus/Kaiku Vitabrand (leche fermentada)	VPP (3-3,75 mg)		
	IPP (2,4-2,7 mg)	Hipertensión moderada	-16 mmHg (8-10 semanas)
Biozate 1 (hidrolizado de proteínas de suero)	VPP (2,4-2,7 mg)		-11 mmHg (5-7 semanas)
	20 g de hidrolizado	Hipertensos	-11 mmHg (-7mmHg DBP) comparado con el control.

Fuente: López Fandiño<sup>77</sup>.

**Tabla 3** Hidrolizados de productos marinos con actividad antihipertensiva

Fuente	IC <sub>50</sub>	Dosis	ΔPS (mmHg)
Bonito	29 µg m.s/ml	15 mg/kg/día	-23 después de 7 semanas
Atún	0,63 µg p/ml	5.000 mg/kg/día	-65 después de 16 días
Sardina	27,1 mg/g	117 mg/kg/	-33 después de 1 h

que describen la existencia de péptidos con actividad antihipertensiva en otras fuentes alimentarias, como músculo de cerdo y pollo, huevos, ajo, gelatina, sake, vino, autolisados bacterianos, hígado, calamar, hongos, jalea real y algunas frutas y té<sup>11,92</sup>. Sin embargo, la información sobre péptidos bioactivos generados a partir de las proteínas de estos alimentos es todavía limitada.

En el momento actual se han descrito algunos péptidos con actividad vasodilatadora e inhibidora de la ECA, que provienen de la ovoalbúmina hidrolizada con diferentes enzimas. Por ejemplo, la administración crónica (12 semanas) a ratas SHR de un hidrolizado de yemas de huevo ha eliminado el desarrollo de la hipertensión en dosis de 20, 100 y 500 mg/kg administrados diariamente por vía oral. Dosis más altas administradas a animales han disminuido alrededor del 10% las presiones sistólica y diastólica medias, en comparación con las de los animales testigos<sup>93</sup>.

### Biodisponibilidad de los péptidos bioactivos

El potencial efecto hipotensivo de los péptidos inhibidores de la ECA depende de su capacidad para alcanzar intactos los órganos donde van a realizar su función. Como ya se ha

comentado, son muchos los estudios realizados en los que se evalúa la actividad IECA de estos péptidos, pero es difícil establecer una relación directa entre la capacidad de inhibir la ECA *in vitro* y la actividad antihipertensiva *in vivo*. El estudio de la biodisponibilidad de los péptidos bioactivos es fundamental a la hora de diseñar alimentos funcionales con propiedades fisiológicas<sup>94</sup>. Se sabe que dipéptidos y tripéptidos pueden transportarse a través de la mucosa intestinal, aunque también hay evidencias de que péptidos de mayor tamaño pueden absorberse en el intestino delgado<sup>63</sup>. Se ha demostrado, por tanto, que algunos péptidos con actividad IECA y antihipertensiva son capaces de absorberse en el tracto gastrointestinal acumulándose en diversos órganos, por lo que podrían ejercer su mecanismo de acción sistémicamente<sup>19</sup>. Sin embargo, se postula que determinados péptidos antihipertensivos podrían no absorberse en el tracto intestinal, ejerciendo una función directa en el lumen intestinal, o bien podrían ejercer su función mediante la interacción con receptores que se encuentran en la pared del intestino.

Una vez absorbidos, el elevado número de peptidasas que se encuentran en la sangre hace que el tiempo durante el que ciertos péptidos permanecen estables en el plasma sea muy corto. Sin embargo, existen algunas evidencias de que péptidos con actividad IECA pueden

absorberse en el tracto digestivo y ser transportados por el torrente circulatorio sin ser hidrolizados por las proteasas sanguíneas<sup>13</sup>.

## Bibliografía

1. Korhonen H. Technology options for new nutritional concepts. *Int Jour Dairy Tech.* 2002;55:79–88.
2. Diehl-Jones WL, Askin DF. Nutritional modulation of neonatal outcomes. *AACN Clin Issues.* 2004;15:83–96.
3. Field CJ. The immunological components of human milk and their effect on immune development of infants. *J Nutr.* 2005;135:1–4.
4. Lonnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:1537S–43S.
5. Meisel H. Overview on milk protein-derived peptides. *Int Dairy J.* 1998;8:363–73.
6. Pihlanto-Leppälä A. Trends Food Sci Technol. 2000;11:347–56.
7. Shahidi A, Zhong B. Bioactive peptides. *Jour Aoac Int.* 2008;91:914–31.
8. FitzGerald RJ, Meisel H. Milk protein derived inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *Br J Nutr.* 2000;84:S33–7.
9. Korhonen H, Pihlanto A. Food-derived bioactive peptides—opportunities for designing future foods. *Curr Pharm Design.* 2003;9:1297–308.
10. Robert PR, Zaloga GP. Dietary bioactive peptides. *New Horizons.* 1994;2:237–43.
11. Rutherford-Markwick KJ, Moughan PJ. Bioactive peptides derived from food. *J AOAC Int.* 2005;88:955–66.
12. Meisel H. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors.* 2004;21:55–61.
13. Vermeirssen V, Van Camp J, Verstraete W. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br J Nutr.* 2004;92:357–66.
14. Martínez Augustin O, Martínez de Victoria Muñoz E. Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutr Hosp.* 2006;21:1–14.
15. Pihlanto A, Korhonen H. Bioactive peptides and proteins. *Adv Food Nut Res.* 2003;47:175–276.
16. Dziuba J, Niklewicz M, Iwaniak A, Darewicz M, Minkiewicz P. Structural properties of bioactive animal protein fragments accessible for proteolytic enzymes. *Polimery.* 2005;6:424–9.
17. Wang W, Gonzalez E. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *CRFSFS.* 2005;4:63–78.
18. Yamamoto N, Ejiri M, Mizuno S. Biogenic peptides and their potential use. *Curr Pharm Des.* 2003;9:1345–55.
19. Matsui T, Yukiyoshi A, Doi S, Sugimoto H, Yamada H, Matsumoto K. Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR. *Nutr Biochem.* 2002;13:80–6.
20. Gauthier SF, Pouliot Y, Saint-Sauveur D. *Int Dairy J.* 2006;16:1315–23.
21. Agawa Y, Lee S, Ono S, Aoyagi H, Ohno M, Tanoguchi T, et al. Interaction with phospholipid bilayers: ion channel formation, and antimicrobial activity of basic amphipatic  $\alpha$ -helical model peptides of various chain lengths. *J Biol Chem.* 1991;266:20218–22.
22. Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1121:130–6.
23. Farnaud S, Evans RW. Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol.* 2003;40:395–405.
24. Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals.* 2004;17:189–96.
25. Kovacs-Nolan J, Phillips M, Mine Y. Advances in the value of eggs and egg components for human health. *J Agric Food Chem.* 2005;53:8421–31.
26. Cudic M, Otvos LJ. Intracellular targets of antibacterial peptides. *Curr Drug Targets.* 2002;3:101–6.
27. Marshal K. Therapeutic applications of whey protein. *Altern Med Rev.* 2004;9:136–56.
28. Clare DA, Swaisgood HE. Bioactive milk peptides: a prospectus. *J Dairy Sci.* 2000;83:1187–95.
29. Asakura K, Kojima T, Shirasaki K. Evaluation of the effects of antigen specific immunotherapy on chronic sinusitis in children with allergy. *Auris Nasus Larinx.* 1990;17:33–8.
30. Sava G. Pharmacological aspects and therapeutic application of lysozymes. *EXS.* 1996;75:433–49.
31. Li-Chan E, Nakai S. Biochemical basis for the properties of egg white. *Crit Rev Poult Biol.* 1989;2:21–58.
32. Schmitzová J, Klaudiny J, Albert S, Schröder W, Schreckengost W, Hanes J, et al. A family of major royal jelly proteins of the honeybee Apis mellifera L. *Cell Mol Life Sci.* 1998;54:1020–30.
33. Kitts DD, Weiler K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr Pharm Des.* 2003;9:1309–23.
34. Leung EHW, Ng TB. A relatively stable antifungal peptide from buckwheat seeds with antiproliferative activity toward cancer cells. *J Pept Sci.* 2007;13:762–7.
35. Diz MSS, Carvalho AO, Rodrigues R, Neves-Ferreira AGC, Da Cunha M, Alves EW, et al. Antimicrobial peptides from chili pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1760:1323–32.
36. Haque E, Chand R. Milk protein derived bioactive peptides. 2006 [On-line] UK: Disponible en: <http://www.dairyscience.info/bio-peptides.htm>.
37. Teschemacher H, Koch G, Brantl V. Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopoly.* 1997;43:99–117.
38. Pasi A, Mahler H, Lansel N, Bernasconi C, Messiha FS.  $\beta$ -Casomorphin-immunoreactivity in the brain stem of the human infant. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1993;80:305–22.
39. Kitts DD, Yuan YV, Nagasawa T, Moriyama Y. Effect of casein, casein phosphopeptides, and calcium intake on ileal 45Ca disappearance and temporal systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr.* 1992;68:765–81.
40. Lin L, Umahara M, York DA, Bray GA. Betacasomorphins stimulate and enterostatin inhibits the intake of dietary fat in rats. *Peptides.* 1998;19:325–31.
41. Fukudome S, Shimatsu A, Suganuma H, Yohikawa M. Effect of gluten exorphins a5 and b5 on the postprandial plasma insulin level in conscious rats. *Life Sci.* 1995;57:729–34.
42. Schanbacher FL, Talhouk RS, Murray FA, Gherman LI, Willett LB. Milk-borne bioactive peptides. *Int Dairy J.* 1998;8:393–403.
43. Svedber J, de Haas J, Leimenstoll G, Paul F, Teschemacher H. Demonstration of  $\beta$ -casomorphin immunoreactive material *in vitro* digests of bovine milk and in small intestine contents after bovine milk ingestion in adult humans. *Peptides.* 1985;6:825–30.
44. Bray TM. Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress. *Nutrition.* 2000;16:578–81.
45. Gibbs BF, Zouzman A, Masse R, Mulligan C. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Res Int.* 2004;37:123–31.
46. Dávalos A, Gómez-Cordoves C, Bartolomé B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *J Agric Food Chem.* 2004;52:48–54.
47. Kim SK, Byun HG, Park PJ, Shahidi F. Angiotensin I. converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *J Agric Food Chem.* 2001;49:2992–7.
48. Graszkiewicz A, Żelazko M, Trziszka T, Polanowski A. Antioxidative capacity of hydrolysates of hen egg proteins. *Pol J Food Nutr Sci.* 2007;57:195–9.
49. Gobetti M, Stepaniak L, De Angelis M, Corsetti A, Di Cagno R. Latent bioactive peptides in milk proteins: Proteolytic

- activation and significance in dairy processing. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2002;42:223–39.
50. Venéreo JR. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cub Med Mil.* 2002;31:126–33.
  51. Nagaoka S, Miwa K, Eto M, Kuzuya Y, Hori G, Yamamoto K. Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and Caco-2 cells. *J Nutr.* 1999;129:1725–30.
  52. Nagaoka S, Futamura Y, Miwa K, Awano T, Yamauchi K, Kanamaru Y, et al. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk betalactoglobulin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;281:11–7.
  53. Sirtori CR, Lovati MR, Manzoni C, Monetti M, Pazzucconi F, Gatti EJ. Soy and cholesterol reduction: clinical experience. *Nutr.* 1995;125:598S–605S.
  54. Morimatsu F, Kimura S. Hypocholesterolemic effect of partial hydrolyses of pork meat in rats. *J Jpn Soc Food Sci Technol.* 1992;39:770–7.
  55. Morimatsu F, Ito M, Budijanto S, Watanabe I, Furukawa Y, Kimura S. Plasma cholesterol-suppressing effect of papain-hydrolyzed pork meat in rats fed hypercholesterolemic diet. *J Nutr Sci Vitaminol.* 1996;42:145–53.
  56. Pedroche J, Yust MM, Lqari H, Megias C, Giron-Calle J, Alaiz M, et al. Obtaining of Brassica carinata protein hydrolysates enriched in bioactive peptides using immobilized digestive proteases. *Food Res Int.* 2007;40:931–8.
  57. Miyashita M, Akamatsu M, Ueno H, Nakagawa Y, Nishimura K, Hayashi Y, et al. Structure-activity relationships of RGD mimetics as fibrinogen-receptor antagonists. *Biosci Biotech Biochem.* 1999;63:1684–90.
  58. Darragh AJ. Physiological impact of milk protein-encrypted bioactive peptides. *Bull Int Dairy Fed.* 2002;375:25–31.
  59. Jollès P, Lévy-Toledano S, Fiat AM, Soria C, Gillensen D, Thomaidis A, et al. Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from  $\kappa$ -casein on platelet function. *Europ J Biochem.* 1986;158:379–82.
  60. Mazoyer E, Lévy-Toledano S, Rendu F, Hermant L, Lu H, Fiat AM. KRDS, a new peptide derived from human lactotransferrin, inhibits platelet aggregation and release reaction. *Eur J Biochem.* 1990;194:43–9.
  61. Shebuski RJ, Berry DE, Romoff R, Storer BL, Ali F, Samanen J. Demonstration of Ac-Arg-Gly-Asp-Ser-NH<sub>2</sub> as an antiaggregatory agent in the dog by intracoronary administration. *Thromb Haemostasis.* 1989;61:183–8.
  62. Cook JJ, Huang TF, Rucinsky B, Tuma RF, Williams JA, Niewiarowski S. Inhibition of platelet hemostatic plug formation by trigramin, a novel RGD peptide. *Circulation.* 1988;78:1248–53.
  63. Chabance B, Marteau P, Rambaud JC, Migliore-Samour D, Boynard M, Perrotin P, et al. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk and yogurt. *Biochimie.* 1998;80:155–65.
  64. Ondetti MA, Cushman DW. Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Ann Rev Biochem.* 1982;51:283–308.
  65. Hernández-Ledesma B, Miralles B, Amigo L, Ramos M, Recio I. Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *J Sci Food Agric.* 2005;85:1041–8.
  66. Miguel M, López-Fandino R, Ramos M, Aleixandre A. Short-term effect of egg-white hydrolysate products on the arterial blood pressure of hypertensive rats. *British J Nutr.* 2005;94:731–7.
  67. Gouda KGM, Gouda LR, Rao AGA, Prakash V. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from glycinin, the 11S globulin of soybean (Glycine Max). *J Agric Food Chem.* 2006;54:4568–73.
  68. Silva SV, Pihlanto A, Malcata FX. Bioactive peptides in ovine and caprine cheeselike systems prepared with proteases from *Cynara cardunculus*. *J Dairy Sci.* 2006;89:3336–44.
  69. Hernández-Ledesma B, Martín-Álvarez PJ, Pueyo E. Assessment of the spectrophotometric method for determination of angiotensin-converting-enzyme activity: Influence of the inhibition type. *J Agric Food Chem.* 2003;51:4175–9.
  70. Wyvratt MJ, Patchett AA. Recent developments in the design of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Med Res Rev.* 1985;5:485–531.
  71. Okitsu M, Morita A, Kakitani M, Okada M, Yokogoshi H. Inhibition of the endothelin-converting enzyme by pepsin digests of food proteins. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1995;59:325–6.
  72. Maruyama S, Suzuki H. A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric Biol Chem.* 1982;46:1393–4.
  73. Yamamoto N, Akino A, Takano T. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci.* 1994;77:917–22.
  74. Gobbetti M, Ferranti P, Smacchi E, Goffredi F, Addeo F. Production of angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbreueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *App Environ Microbiol.* 2000;66:3898–904.
  75. Kuwabara Y, Nagai S, Yoshimitsu N, Nakagawa I, Watanabe Y, Tamai Y. Antihypertensive effect of the milk fermented by culturing with various lactic acid bacteria and a yeast. *J Ferm Bioengg.* 1995;80:294–5.
  76. Saito T, Nakamura T, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *J Dairy Sci.* 2000;83:1434–40.
  77. Smacchi E, Gobbetti M. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiol.* 2000;17:129–41.
  78. Ryhänen EL, Pihlanto-Leppälä A, Pakkala E. A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *Int Dairy J.* 2001;11:441–7.
  79. Fitzgerald R, Murray B, Walsh D. Hypotensive peptides from milk proteins. *Am Soc Nutr Sci.* 2004;134:980S–8S.
  80. Lopez-Fandino R, Otte J, Van Camp J. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE inhibitory activity. *Int Dairy J.* 2006;16:1277–93.
  81. Astawan M, Wahyuni M, Yasuhara T, Yamada K, Tadokoro T, Mae-kawa A. Effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances derived from Indonesian dried-salted fish on blood pressure of rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1995;59:425–9.
  82. Suetsuna K, Osajima K. Blood pressure reduction and vasodilatory effects *in vivo* of peptides originating from sardine muscle. *J Jpn Soc Nutr Food Sci.* 1989;42:47–54.
  83. Fujita H, Yokoyama K, Yasumoto R, Yoshikawa M. Antihypertensive effect of thermolysin digest of dried bonito in spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1995;22 Suppl 1:S304–305.
  84. Suetsuna K, Chen JR. Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microalgae. *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. *Mar Biotechnol.* 2001;3:305–9.
  85. Fujita H, Yamagami T, Ohshima K. Effects of an ACE-inhibitory agent, katsuo bushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in the borderline and mildly hypertensive subjects. *Nutr Res.* 2001;21:1149–58.
  86. Matsui T, Li CH, Osajima Y. Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition from wheat germ. *J Pept Sci.* 1999;5:289–97.
  87. Yust M, Pedroche J, Giron-Calle J, Alaiz M, Millán F, Vioque J. Production of ACE inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Food Chem.* 2003;81:363–9.
  88. Saiga A, Kanda K, Wei Z, Okumura T, Kaneko T, Nishimura T. Hypotensive activity of muscle protein and gluten

- hydrolysates obtained by protease treatment. *J Food Biochem.* 2003;26:391–401.
89. Marczak ED, Usui H, Fujita H, Yang Y, Yokoo M, Lipkowski AW. New antihypertensive peptides isolated from rapeseed. *Peptides.* 2003;24:791–8.
90. Martin DS, Breitkopf NP, Eyster KM, Williams JL. Dietary soy exerts an antihypertensive effect in spontaneously hypertensive female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;281:R553–60.
91. Oshima G, Shimabukuro H, Nagasawa K. Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. *Biochim Biophys Acta.* 1979;566:128–37.
92. Arihara K, Nakashima Y, Mukai T, Ishikawa S, Itoh M. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Sci.* 2001;57:319–24.
93. Yoshii H, Tachi N, Ohba R, Sakamura O, Takeyama H, Itani T. Antihypertensive effect of ACE inhibitory oligopeptides from chicken egg yolks. *Comp Biochem Physiol.* 2001;C128:27–33.
94. Shimizu M. Food-derived peptides and intestinal functions. *Bio-factors.* 2004;21:43–7.