

Revisión

Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de leche y huevo

A. Aleixandre¹, M. Miguel¹ y B. Muguerza²

¹Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. ²Nutraceutical Group. Quart de Poblet. Valencia. España.

Resumen

Algunos fragmentos de proteínas alimentarias, una vez liberados mediante hidrólisis, pueden producir un descenso del tono arterial. Son importantes los hidrolizados y péptidos provenientes de proteínas lácteas. Destacan los hidrolizados de caseína con tripsina, y los productos antihipertensivos obtenidos por fermentación de la leche con *Lactobacillus helveticus*. Estos productos contienen secuencias como Val-Pro-Pro (VPP) e Ile-Pro-Pro (IPP), que inhiben la enzima convertidora de la angiotensina (ECA). Algunas cepas de *Enterococcus faecalis* también producen péptidos antihipertensivos inhibidores de la ECA. Entre estos péptidos destaca la secuencia LHLPLP. Existen asimismo péptidos e hidrolizados antihipertensivos derivados de proteínas de huevo. Podemos citar las secuencias FRADHPFL (ovokinina) y RADHPF (ovokinina 2-7) con actividad vasodilatadora endotelio-dependiente, y algunos hidrolizados de clara de huevo que inhiben la ECA.

Los productos mencionados podrían utilizarse como ingredientes en alimentos funcionales. Algunos han probado ya su eficacia y seguridad en pacientes hipertensos.

(Nutr Hosp. 2008;23:313-318)

Palabras clave: Péptidos bioactivos. Hipertensión. Enzima convertidora de la angiotensina. Leche. Huevo.

PEPTIDES WITH ANTIHYPERTENSIVE ACTIVITY OBTAINED FROM MILK AND EGG PROTEINS

Abstract

Antihypertensive hydrolysates and peptides have been isolated from food proteins. Among them, there are of particular interest the antihypertensive casein hydrolysates, and some antihypertensive products obtained when milk was fermented by *Lactobacillus helveticus*. The sequences Val-Pro-Pro (VPP) and Ile-Pro-Pro (IPP), with angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity, have been isolated from these fermented products. Selected *Enterococcus faecalis* strains can also produce milk derived peptides with ACE inhibitory and antihypertensive activities. The main of them is the sequence LHLPLP. Some studies also describe the production of antihypertensive hydrolysates and peptides from egg proteins. The sequences FRADHPFL (ovokinin) and RADHPFL (ovokinin 2-7), that have shown endothelium-dependent vasodilator activity, were obtained at first. Some egg white hydrolysates with ACE inhibitory activity have also been described.

The idea of including the abovementioned products as functional food ingredients is particularly attractive. Some of them have already proved their safety and effectiveness in hypertensive patients.

(Nutr Hosp. 2008;23:313-318)

Key words: Bioactive peptides. Hypertension. Angiotensin-converting enzyme. Milk. Egg.

Introducción

En estos últimos años la sociedad se ha concienciado de la estrecha relación que existe entre dieta y salud. Como consecuencia de ello, han irrumpido con fuerza

en el sector alimentario los alimentos funcionales. Los alimentos funcionales se definen como los alimentos y componentes alimentarios que, tomados como parte de la dieta, proporcionan beneficios más allá de sus valores nutricionales tradicionales, bien sea mejorando una función del organismo o reduciendo el riesgo de enfermedad¹. La investigación realizada para elaborar estos alimentos ha dedicado especial atención al estudio del papel fisiológico de las proteínas de la dieta. Algunos fragmentos de la secuencia de estas proteínas, pueden liberarse mediante hidrólisis y exhibir actividad biológica. Estos fragmentos, o péptidos bioactivos, se generan usualmente *in vivo* por acción de las enzimas gas-

Correspondencia: M. A. Aleixandre.
Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina.
Universidad Complutense.
28040 Madrid, España.
E-mail: amaya@med.ucm.es

Recibido: 3-IX-2007.
Aceptado: 16-I-2008.

trointestinales, pero pueden también obtenerse *in vitro* con enzimas específicas, o producirse durante los procesos de elaboración de determinados alimentos.

Desde su descubrimiento, en 1979, se han descrito péptidos bioactivos con diferentes actividades biológicas². Algunos son capaces de producir un descenso del tono arterial y permiten controlar la hipertensión. Esta enfermedad es la primera causa de mortalidad en los países desarrollados. Aunque su detección y control son relativamente sencillos, la realidad es que muchos pacientes hipertensos no tienen conocimiento de su enfermedad, y otros están diagnosticados pero reciben un tratamiento inadecuado. Es, por ello, obvio el interés que actualmente tiene la investigación sobre péptidos antihipertensivos de origen alimentario. Los alimentos funcionales que los contienen pueden representar una nueva estrategia para la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión.

Se han obtenido péptidos antihipertensivos a partir de proteínas de distintos alimentos de origen animal³⁻⁷ y vegetal⁸⁻¹⁰. Los principales son péptidos antihipertensivos que provienen de proteínas lácteas. Esto es importante, ya que la leche es un alimento primario en la sociedad actual. Las proteínas del huevo son una fuente muy importante de nitrógeno en la dieta, y este alimento juega también un papel fundamental en la nutrición humana. Pese a ello, muy pocos estudios han abordado la producción de péptidos bioactivos a partir de proteínas de huevo. La presente revisión señala algunos de los hallazgos importantes de la investigación actual sobre péptidos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias, y se centra en los estudios realizados en la última década con productos y péptidos antihipertensivos obtenidos a partir de proteínas de leche y de huevo.

Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de leche

Las proteínas lácteas son una de las fuentes principales de péptidos bioactivos. Estos péptidos pueden producirse por hidrólisis de las proteínas lácteas con diferentes enzimas, y también por fermentación de la leche con distintas bacterias.

El estudio de Sekiya y cols., en 1992, es uno de los primeros que aborda la producción de productos antihipertensivos derivados de proteínas de leche. Estos investigadores demostraron que el consumo de 20 g/día de un hidrolizado de caseína con tripsina durante 4 semanas, producía una disminución de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) en pacientes hipertensos^{11,12}. El producto se comercializó en Japón con el nombre de "Casein DP". Posteriormente, se comercializó en Holanda otro hidrolizado de caseína con tripsina, que disminuía también la presión arterial en pacientes hipertensos^{13,14}. Este nuevo hidrolizado se comercializó con el nombre de "C12 Peptide".

Los hidrolizados de proteínas de suero lácteo han mostrado también efecto beneficioso para el control de la presión arterial. En este contexto, Pins y Keenan demostraron que el consumo de 20 g/día de un hidrolizado de proteínas de suero lácteo, durante 6 semanas, reducía significativamente la PAS y la PAD en pacientes prehipertensos sin medicar. Cinco semanas después de finalizar la ingesta del hidrolizado, pudo apreciarse todavía su efecto. Hay que señalar, además, que los pacientes de este estudio presentaban hipercolesterolemia, y el hidrolizado disminuyó los niveles de LDL colesterol^{15,16}. Este producto se comercializa actualmente en Estados Unidos con el nombre de "Biozate".

Es también importante la producción de péptidos antihipertensivos por fermentación láctea. *Lactobacillus helveticus* tiene usualmente mayor actividad proteolítica que otras bacterias, y muchos de estos péptidos se han obtenido fermentando la leche con esta bacteria. Como ejemplo, podemos citar el producto lácteo comercializado en Japón por Calpis (Calpis Co. Ltd., Japan), que se preparaba por fermentación de leche desnatada con *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Nakamura y cols., en 1995, comprobaron que la leche Calpis mostraba efecto antihipertensivo en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), después de su administración oral aguda a estos animales¹⁶. El grupo japonés demostró que los péptidos Val-Pro-Pro (VPP) e Ile-Pro-Pro (IPP), eran los principales responsables de la actividad antihipertensiva de esta leche¹⁷⁻²⁰. Estos péptidos también mostraron efecto antihipertensivo. Un estudio doble ciego realizado por el mismo grupo, demostró poco después que la ingesta de 95 ml/día de leche Calpis, durante 8 semanas, reducía significativamente la PAS y la PAD en pacientes hipertensos que mantenían durante el ensayo su medicación antihipertensiva²¹. Recientemente se ha demostrado también el efecto de esta leche en sujetos hipertensos que no reciben medicación antihipertensiva. En el ensayo, los pacientes ingerían 160 g/día de leche durante 4 semanas²². El producto, denominado comercialmente "Ameal Peptide"[®] por Calpis, se ha añadido a una nueva bebida láctea lanzada por Unilever, que se ha comercializado en España con el nombre de "Flora Proactive"[®].

Los estudios de Sipola y cols., pusieron también de manifiesto el efecto antihipertensivo de los péptidos VPP e IPP en ratas SHR²³. Este grupo demostró, asimismo, el efecto antihipertensivo de una leche fermentada con *Lactobacillus helveticus* LBK-16H, que contenía ambos tripéptidos²⁴. La ingesta de 150 ml/día de esta leche, durante varias semanas, ocasionó una moderada, pero incuestionable, disminución de la presión arterial en sujetos hipertensos que no recibían ninguna medicación antihipertensiva²⁵⁻²⁷. El producto lácteo se comercializó en Finlandia por la empresa Valio con el nombre de "Evolus". Actualmente la empresa Kaiku lo ha introducido en España con el nombre de "Kaiku Vitabrand".

El principal mecanismo implicado en el efecto de los péptidos antihipertensivos de origen alimentario, y

también en el efecto de los péptidos lácteos anteriormente mencionados, es la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Ambas secuencias, VPP e IPP, se caracterizaron como potentes inhibidoras de la ECA. Este mecanismo justifica, de hecho, en la mayoría de los casos, el efecto de los productos funcionales con actividad antihipertensiva. Hay que tener en cuenta que la ECA promueve la separación del dipéptido carboxiterminal de la angiotensina I, un decapeptido inactivo, y cataliza su conversión en angiotensina II, un octapéptido con una potente actividad vasoconstrictora. La ECA retira, además, de forma secuencial, dos péptidos carboxiterminales en la estructura de la bradikinina, e inactiva esta molécula vasodilatadora²⁸. Esta enzima juega por eso un papel crucial en el mantenimiento de la tensión arterial, y en el daño orgánico secundario a la elevación de esta variable. Su implicación en la modulación del tono arterial puede ser crítica en algunos pacientes hipertensos y, de hecho, los inhibidores de la ECA son en el momento actual un grupo farmacológico prioritario para el tratamiento de la hipertensión. La inhibición de la formación de angiotensina II *in vitro* es, además, un "test" frecuente para evaluar fármacos antihipertensivos.

Nuestro grupo de investigación, en colaboración con el Grupo Leche Pascual, ha demostrado que algunas cepas seleccionadas de *Enterococcus faecalis*, son capaces de producir otros péptidos inhibidores de la ECA, distintos de los péptidos VPP e IPP. Entre ellos, destaca la secuencia LHLPLP (β -casein f133-138)²⁹. La leche fermentada por estas cepas de *Enterococcus faecalis*, presentó actividad antihipertensiva en ratas SHR, cuando se administró de forma aguda, por vía oral, a estos animales³⁰. Los péptidos inhibidores de la ECA, identificados en la leche, también disminuyeron la presión arterial de las ratas SHR cuando se administraron en dosis única, por vía oral. Estos péptidos no modificaron la presión arterial de las ratas Wistar-Kyoto (WKY), que son el control normotenso de las SHR³¹. Se comprobó también que el producto obtenido al fermentar la leche con *Enterococcus faecalis*, atenúa el desarrollo de hipertensión en las ratas SHR, cuando se administraba desde el momento del destete, de forma continuada, por vía oral, a estos animales. Las propiedades antihipertensivas del producto fermentado con *Enterococcus faecalis*, mejoraron cuando este producto se había enriquecido en calcio³².

Se han aislado y caracterizado también varios péptidos con actividad inhibidora de la ECA, y con actividad antihipertensiva, a partir de algunos hidrolizados que se obtienen al tratar la α -Lactoglobulina y la β -Lactoglobulina de la leche con enzimas digestivas^{21,33-36}. Recientemente se han identificado dos péptidos con una potente actividad inhibidora de la ECA derivados de la β -Lactoglobulina de la leche de cabra³⁷. Estos péptidos, que corresponden a las secuencias Leu-Gln-Lys-Trp (LQKW) y Leu-Leu-Phe (LLF), se liberan tras la incubación de suero lácteo con termolisina, a 37 °C, durante 24 horas. Ambas secuencias mostraron

efectos antihipertensivos en ratas SHR, cuando se administraron en dosis única, por vía oral, a estos animales³⁸.

Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de huevo

Hasta este momento se han descrito muy pocos péptidos bioactivos procedentes de proteínas de huevo. Los primeros fueron dos péptidos antihipertensivos que tenían actividad directa en vasos. El primero fue un octapéptido antihipertensivo y relajante vascular, aislado por Fujita y cols. (1995a), que tenía la secuencia aminoacídica Phe-Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu (FRADHPFL)³⁹. Esta secuencia corresponde al fragmento 358-365 de la ovoalbúmina, que es la proteína mayoritaria de la clara de huevo. El péptido en cuestión, mostró actividad vasodilatadora parcialmente dependiente de endotelio en arterias mesentéricas caninas, y se denominó ovokinina. Su efecto estaba, en parte, mediado por receptores B₁, que estimulan la liberación de prostaciclina. La ovokinina mostró efectos antihipertensivos cuando se administró a ratas SHR en dosis altas. El efecto antihipertensivo de la ovokinina se potenciaba cuando el péptido se administraba oralmente a las ratas emulsionado en yema de huevo. Se postuló que los fosfolípidos de la yema de huevo aumentaban la disponibilidad oral de la ovokinina, porque mejoraban su absorción intestinal, y porque protegían al péptido de la digestión por las peptidasas intestinales⁴⁰.

El segundo péptido aislado de las proteínas del huevo, fue un hexapéptido con actividad relajante vascular, que se caracterizó como el fragmento 2-7 de la ovokinina. Se denominó por eso ovokinina (2-7). Su secuencia era la siguiente: Arg-Ala-Asp-His-Phe-Leu (RADHPPF)⁴¹. Esta secuencia se purificó a partir de un hidrolizado de ovoalbúmina con quimiotripsina, y se vio que correspondía a los residuos 359-364 de esta proteína. El péptido causaba relajación endotelio dependiente en las arterias mesentéricas de las ratas SHR. Esta relajación estaba principalmente mediada por óxido nítrico. No producía, por el contrario, relajación en las arterias de las ratas normotensas WKY. La presión arterial de las ratas SHR disminuía cuando se administraban por vía oral dosis de ovokinina (2-7) diez veces inferiores a las dosis eficaces de ovokinina, pero la presión de las ratas WKY no se modificaba cuando se administraban por esta vía las mismas dosis de dicho péptido. Se comprobó que la administración intravenosa de ovokinina (2-7), en las dosis mencionadas, no causaba cambios significativos en la presión arterial de las ratas SHR. La administración por esta vía de concentraciones muy elevadas del péptido, sólo ocasionaba, paradójicamente, una leve disminución de esta variable⁴². Los estudios de reactividad vascular en arterias aisladas de ratas, realizados en 2004 por Scruggs y cols., han demostrado que la ovokinina (2-7)

produce sus efectos por activación de receptores vasculares B₂ de bradikina⁴³.

Se ha intentado mejorar la actividad oral de los péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de huevo mediante modificaciones estructurales. Se han sintetizado, por ejemplo, algunos derivados de la ovokina (2-7), para mejorar su actividad antihipertensiva por vía oral. Entre ellos, podemos destacar los péptidos Arg-Pro-Phe-His-Pro-Phe (RPFHPF) y Arg-Pro-Leu-Lys-Pro-Trp (RPLKPW). Estas secuencias han mostrado, respectivamente, diez y cien veces más actividad que la ovokina (2-7), tras su administración oral a ratas SHR. Las sustituciones de aminoácidos realizadas, conferían probablemente a estos péptidos mayor resistencia a las proteasas del tracto digestivo^{42,44}.

Hemos destacado anteriormente la inhibición de la ECA, como principal mecanismo implicado en el efecto de los péptidos antihipertensivos de origen alimentario. En este contexto, cabe resaltar que Fujita y cols. (2000), comprobaron que los hidrolizados de ovoalbúmina con pepsina y termolisina presentaban actividad inhibidora de este enzima. La concentración de los hidrolizados necesaria para inhibir un 50% la actividad de la ECA (IC₅₀), era, respectivamente, 45 µg/ml y 83 µg/ml. Se aislaron seis péptidos con actividad inhibidora de la ECA a partir del hidrolizado de ovoalbúmina con pepsina. Estos péptidos tenían valores de IC₅₀ comprendidos entre 0,4 µM y 15 µM, pero de ellos sólo el dipéptido Leu-Trp (LW) mostró actividad antihipertensiva en ratas SHR. Fujita y cols., no consiguieron hidrolizados activos al tratar la ovoalbúmina con tripsina o quimiotripsina. Los valores de IC₅₀ obtenidos por

estos investigadores para estos hidrolizados eran, de hecho, mayores de 1.000 µg/ml⁴⁵.

Algunos estudios de nuestro grupo de investigación, han demostrado también que la hidrólisis de las proteínas de la clara de huevo con diferentes enzimas de origen digestivo, proporciona hidrolizados con elevada actividad inhibidora de la ECA. Los hidrolizados más potentes se obtuvieron cuando se hidrolizó la clara de huevo con pepsina, y el tiempo de hidrólisis era importante para la potencia del hidrolizado. Cuando el tiempo de incubación era superior a 30 minutos, se consiguieron hidrolizados activos que tenían valores de IC₅₀ relativamente bajos. La hidrólisis de la clara de huevo con pepsina durante tres horas, proporcionó un hidrolizado con potente actividad inhibidora de la ECA, que tenía un valor de IC₅₀ de 55 µg/ml. La ultrafiltración de este hidrolizado, permitió obtener una fracción con masa molecular menor de 3.000 Da, que presentó mucha más actividad inhibidora de la ECA que el propio hidrolizado. Esta fracción tenía un valor de IC₅₀ de 34 µg/ml. En ella se identificaron varios péptidos con actividad inhibidora de la ECA. Los péptidos más potentes correspondían a las secuencias Tyr-Arg-Glu-Glu-Arg-Tyr-Pro-Ile-Leu (YAEERYPIL), Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu (RADHPFL) e Ile-Val-Phe (IVF). Estas secuencias presentaron respectivamente valores de IC₅₀ iguales a 4,7, 6,2 y 33,11 µM. En contraste con los resultados aportados por Fujita y cols., en nuestro laboratorio pudimos conseguir también hidrolizados activos cuando la hidrólisis de las proteínas de la clara de huevo se producía con tripsina o quimiotripsina, pero en este caso se requería como mínimo un tiempo de incubación de 24 horas⁴⁶.

Tabla I
Péptidos derivados de proteínas de leche y huevo con actividad antihipertensiva

Secuencia	Origen	Enzima	Actividad demostrada	Referencia
VPP, IPP	β-caseína	Proteinasa de <i>Lactobacillus helveticus</i>	IECA/Antihipertensiva	17,18,19,23
VYP, VYFPFG	β-caseína	Proteinasa K	Antihipertensiva	5
KVLPVP, KVLPVPQ	β-caseína	Proteinasa de <i>Lactobacillus helveticus</i>	Antihipertensiva	3
LHLPLP	β-caseína	Proteinasa de <i>Enterococcus faecalis</i>	IECA/Antihipertensiva	29,30
FFVAPFPEVFGK	α _{s1} -caseína	Tripsina	IECA/Antihipertensiva	13,14
ALPMPHIR	β-lactoglobulina	Tripsina	IECA/Antihipertensiva	4
LLF, LKQW	β-lactoglobulina	Termolisina	IECA/Antihipertensiva	37,38
IPA	β-lactoglobulina	Varias enzimas	IECA/Antihipertensiva	5
YGLF	α-lactoglobulina	Varias enzimas	Antihipertensiva	35,36
FRADHPFL	Ovoalbúmina	Pepsina	Relajante vascular/Antihipertensiva	39,40
RADHPF	Ovoalbúmina	Quimiotripsina	Relajante vascular /Antihipertensiva	41,43
YAEERYPIL, RADHPFL, IVF	Proteínas de la clara de huevo	Pepsina	IECA/Antihipertensiva	46,47
LW	Ovoalbúmina	Pepsina	IECA/Antihipertensiva	45
RADHP	Proteínas de la clara de huevo	Pepsina/Corolasa PP	IECA /Antihipertensiva	49
Oligopéptidos	Proteínas de la yema de huevo	Varias enzimas	IECA/Antihipertensiva	50

IECA: Inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina.

El hidrolizado obtenido en nuestro laboratorio cuando se trataba la clara de huevo con pepsina durante 3 horas, su fracción menor de 3.000 Da, y las secuencias peptídicas YAEERYPIL, RADHPFL e IVF, mostraron claros efectos antihipertensivos. Estos productos ocasionaron una disminución significativa de la PAS, y de la PAD, en las ratas SHR, cuando se administraban en dosis única por vía oral. Estas mismas administraciones no modificaron la presión arterial de las ratas normotensas WKY⁴⁷, pero se comprobó que el hidrolizado atenuaba también el desarrollo de hipertensión arterial en las ratas SHR, cuando se administraba por vía oral a estos animales desde el destete⁴⁸. Estudios paralelos simulando la digestión gastrointestinal, han indicado que las secuencias YAEERYPIL y RADHPFL se hidrolizan cuando se administran por vía oral⁴⁹. Es muy probable, por lo tanto, que los productos resultantes de esta hidrólisis sean responsables del efecto que se observa al administrar estas secuencias, y probablemente estos productos sean también responsables, al menos en parte, del efecto antihipertensivo del hidrolizado⁴⁹.

Cabe por último mencionar que también se han producido algunos péptidos con actividad antihipertensiva por hidrólisis enzimática de las proteínas de la yema de huevo. Así, Yoshii y cols. (2001), han demostrado que pueden producirse oligopéptidos inhibidores de la ECA, cuando se hidroliza con diferentes enzimas la yema de huevo. La administración oral a ratas SHR de distintas dosis de estos oligopéptidos, causó disminuciones significativas de la presión arterial sistólica y diastólica⁵⁰.

En la tabla I figuran algunos péptidos obtenidos a partir de proteínas de leche y de huevo que pueden presentar actividad antihipertensiva.

Conclusiones

Los resultados de las investigaciones mencionadas anteriormente, sugieren la posibilidad de utilizar los hidrolizados y péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de leche y huevo con fines sanitarios. Resulta especialmente atractiva la idea de utilizarlos como ingredientes en alimentos funcionales para la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión. Algunos de ellos han probado ya su eficacia y seguridad en pacientes hipertensos, y se han comercializado en alimentos que se utilizan actualmente con esta finalidad.

Referencias

1. Martínez Agustín O, Martínez de Victoria Muñoz E. Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutr Hosp* 2006; 21(Supl. 2):1-14.
2. Gobbetti 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.
3. Maeno M, Yamamoto N, Takano T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a pro-

teinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci* 1996; 79:1316-321.

4. Mullaly MM, Meisel H, FitzGerald RJ. Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Lett* 1997; 402:99-101.
5. Abubakar A, Saito T, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *J Dairy Sci* 1998; 81:1313-138.
6. 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; 83:1434-440.
7. Fujita H, Yamagami T, Ohshima K. Effects of an ACE-inhibitory agent, katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in borderline and mildly hypertensive subjects. *Nutr Res* 2001; 21:1149-158.
8. Wu J, Ding X. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* 2001; 49:501-06.
9. Soares de Moura R, Costa Viana FS, Souza MAV, Kovary K, Guedes DC, Oliveira EPB, Rubenich LSM, Carvalho LC, Oliveira RM, Tano RM, Gusmão T, Correia ML. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. *J Pharmacy Pharmacol* 2002; 54:1515-520.
10. Yang Y, Marczak ED, Usui H, Kawamura Y, Yoshikawa M. Antihypertensive properties of spinach leaf protein digests. *J Agric Food Chem* 2004; 52:2223-225.
11. Sekiya S, Kobayashi Y, Kita E, Imamura Y, Toyama S. Antihypertensive effects of tryptic hydrolysate of casein on normotensive and hypertensive volunteers. *J Nutr Food Sci* 1992; 45:513-17.
12. Sugai, R. ACE inhibitors and functional foods. *Bulletin of the IDF*. 1998; 336:17-20.
13. Karaki H, Doi K, Sugano S, Uchiya H, Sugai R, Murakami U, Takemoto S. Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comp Biochem Physiol* 1990; 96C:367-71.
14. Townsend RR, McFadden CB, Ford V, Cadeé JA. A randomized, double-blind, placebo controlled trial of casein protein hydrolysate (C12 peptide) in human essential hypertension. *Am J Hyperten* 2004; 17:1056-1058.
15. Pins JJ, Keenan JM. The antihypertensive effects of a hydrolysed whey protein isolate supplement (Biozate® 1). *Cardiovasc Drugs Ther* 2002; 16:68.
16. Pins JJ, Keenan JM. The antihypertensive effects of a hydrolysed whey protein isolate supplement (Biozate® 1): a pilot study. *FASEB J* 2003; 17:A1110.
17. Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Takano T, Okubo A, Yamazaki S. Purification and characterization of angiotensin-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J Dairy Sci* 1995; 78:777-783.
18. Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Okubo A, Yamazaki S, Takano TJ. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *J Dairy Sci* 1995; 78:1253-1257.
19. Nakamura Y, Masuda O, Takano T. Decrease of tissue angiotensin I-converting enzyme activity upon feeding sour milk in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotech Biochem* 1996; 60:488-489.
20. Masuda O, Nakamura Y, Takano T. Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 1996; 126:3063-3068.
21. Hata Y, Yamamoto M, Ohni M, Nakajima K, Nakamura Y, Takano T. A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr* 1996; 64:767-71.
22. Mizushima S, Ohshige K, Watanabe J, Kimura M, Kadowaki T, Nakamura Y, Tochikubo O, Ueshima H. Randomized controlled trial of sour milk on blood pressure in borderline hypertensive men. *Am J Hypertens* 2004; 17:701-706.

23. Sipola M, Finckenberg P, Santisteban J, Korpela R, Vapaatalo H, Nurminen M-L. Long-term intake of milk peptides attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Phys Pharm* 2001; 52:745-54.
24. Sipola MP, Finckenberg P, Korpela R, Vapaatalo H, Nurminen MA. Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *J Dairy Res* 2002; 69:103-11.
25. Seppo L, Kerojoki O, Suomalainen T, Korpela R. The effect of a *Lactobacillus helveticus* LBK-16 H fermented milk on hypertension: a pilot study on humans. *Milchwissenschaft* 2002; 57:124-27.
26. Seppo L, Jauhiainen T, Poussa T, Korpela R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr* 2003; 77:326-30.
27. Tuomilehto J, Lindstrom J, Hyryrynen J, Korpela R, Karhunen ML, Mikkola L, Jauhiainen T, Seppo L, Nissinen A. Effect of ingesting sour milk fermented using *Lactobacillus helveticus* bacteria producing tripeptides on blood pressure in subjects with mild hypertension. *J Hum Hypertens* 2004; 18:705-802.
28. Fitzgerald, RJ, Murria BA, Walsh GJ. Hypotensive peptides from milk proteins. *J Nutr* 2004; 134:980S-988S.
29. Quirós A, Ramos M, Muguera B, Delgado MA, Miguel M, Aleixandre A, Recio I. Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *Int Dairy J* 2007; 17:33-41.
30. Muguera B, Ramos M, Sánchez E, Manso MA, Miguel M, Aleixandre A, Delgado MA, Recio I. Antihypertensive activity of milks fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *Int Dairy J* 2006; 16:61-9.
31. Miguel M, Recio I, Ramos M, Delgado MA, Aleixandre MA. Effect of ACE-Inhibitory Peptides Obtained from *Enterococcus faecalis* Fermented Milk in Hypertensive Rats. *J Dairy Sci* 2006; 89:3352-359.
32. Miguel M, Muguera B, Sánchez E, Delgado MA, Recio I, Ramos M, Aleixandre A. Changes in arterial blood pressure of milk fermented by *Enterococcus faecalis* CECT 5728 in spontaneously hypertensive rats. *British J Nutr* 2005; 93:1-9.
33. Pihlanto-Leppala A, Koskinen P, Piilola K, Tupasela T, Korhonen H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *J Dairy Res* 2000; 1:53-64.
34. Chobert JM, El-Zahar K, Sitohy M, Dalgalarrondo M, Metro F, Choiset Y, Haertle T. Angiotensin I-converting-enzyme (ACE)-inhibitory activity of tryptic peptides of ovine beta-lactoglobulin and of milk yoghurts obtained by using different starters. *Lait* 2005; 85(3):141-52.
35. Nurmeinin ML, Sipola M, Kaarto H, Pihlanto-Leppala A, Piilola K, Korpela R, Tossavainen O, Kohonen H, Vapaatalo H. a-lactophin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 2000; 66:535-43.
36. Mullaly MM, Meisel H, Fitzgerald RJ. Synthetic peptides corresponding to α -lactalbumin and β -lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Biol Chem* 1996; 377:259-60.
37. Hernández-Ledesma B, Recio I, Ramos M, Amigo L. Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *Int Dairy J* 2002;12:805-12.
38. Hernández-Ledesma B, Miguel M, Amigo L, Aleixandre MA, Recio I. Effect of simulated gastrointestinal digestion on the antihypertensive properties of β -lactoglobulin peptides. *J Dairy Res* 2007; 74(3):336-39.
39. Fujita H, Usui H, Kurahashi K, Yoshikawa M. Isolation and characterization of Ovokinin, a bradykinin B1 agonist peptide derived from ovalbumin. *Peptides* 1995; 16:785-90.
40. Fujita H, Sasaki R, Yoshikawa M. Potentiation of the antihypertensive activity of orally administered Ovokinin, a vasorelaxing peptide derived from ovalbumin, by emulsification in egg phosphatidyl-choline. *Biosci Biotech Biochem* 1995; 59:2344-345.
41. Matoba N, Usui H, Fujita H, Yoshikawa M. A novel anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin induces nitric oxide-mediated vasorelaxation in an isolated SHR mesenteric artery. *FEBS Lett* 1999; 452:181-84.
42. Matoba N, Yamada Y, Usui H, Nakagiri R, Yoshikawa M. Designing potent derivatives of Ovokinin (2-7), an anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin. *Biosci Biotech Biochem* 2001; 65:636-39.
43. Scruggs P, Filipeanu CM, Yang J, Kang Chang J, Dun NJ. Interaction of ovokinin (2-7) with vascular bradykinin 2 receptors. *Reg Pep* 2004; 120:85-91.
44. Yamada Y, Matoba N, Usui H, Onishi K, Yoshikawa M. Design of a highly potent anti-hypertensive peptide based on Ovokinin (2-7). *Biosci Biotech Biochem* 2002; 66:1213-217.
45. Fujita H, Yokoyama K, Yoshikawa M. Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *J Food Sci* 2000; 65:564-69.
46. Miguel M, Recio I, Gómez-Ruiz JA, Ramos M, López-Fandiño R. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *J Food Prot* 2004; 67:1914-920.
47. Miguel M, López-Fandiño R, Ramos M, Aleixandre MA. Short-term effect of egg white hydrolysate products on the arterial blood pressure of hypertensive rats. *British J Nutr* 2005; 94:731-37.
48. Miguel M, López-Fandiño R, Ramos M, Aleixandre MA. Long-term antihypertensive effect of egg white treated with pepsin in hypertensive rats. *Life Sci* 2006; 78:2960-966.
49. Miguel M, Ramos M, Aleixandre MA, López-Fandiño R. Antihypertensive peptides obtained from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *J Agric Food Chem* 2006; 54:726-31.
50. Yoshii H, Tachi N, Ohba R, Sakamura O, Takemaya H, Itani T. Antihypertensive effect of ACE inhibitory oligopeptides from chicken egg yolks. *Com Biochem Physiol Part C* 2001; 128:27-33.