

REVISIÓN

Péptidos bioactivos en proteínas de reserva

Por J. Vioque, R. Sánchez-Vioque, A. Clemente, J. Pedroche, M. M. Yust y F. Millán*

Instituto de la Grasa. Avda. Padre García Tejero 4. 41012-Sevilla. España.
Tel. 954611550. Fax: 954616790, e-mail: frmillan@cica.es.

RESUMEN

Péptidos bioactivos en proteínas de reserva.

Se ha realizado una revisión de los péptidos bioactivos descritos hasta el momento en proteínas de reserva, principalmente de la leche. Los péptidos bioactivos son pequeñas secuencias aminoacídicas inactivas dentro de la proteína, pero que pueden ser liberados tras la hidrólisis de estas proteínas y ejercer diversas funciones. Entre los más abundantes destacan los péptidos con actividad opioide, opioide antagonista, antitrombótica, inmunomoduladora, transportadora de iones o hipotensora. Se discute la posible presencia de estos péptidos en otras fuentes proteicas, principalmente plantas oleaginosas y su posible aprovechamiento.

PALABRAS-CLAVE: Péptido bioactivo - Proteína de reserva - Revisión (artículo).

SUMMARY

Bioactive peptides in storage proteins.

A review on the bioactive peptides described so far in storage proteins, mainly milk proteins, has been carried out. Bioactive peptides are small amino acid sequences inactive in the native protein, but that can be liberated after hydrolysis of these proteins and exert different functions. Among the main one are bioactive peptides with opioid activity, antagonistic opioid, immunomodulatory, antithrombotic, ion transporting or antihypertensive. The possible presence of these peptides in other protein source, mainly oilseed plants and their possible use is discussed.

KEY-WORDS: Bioactive peptide - Review (paper) - Storage protein.

Las proteínas representan uno de los componentes principales de los alimentos, tanto desde un punto de vista funcional como nutricional. Por una parte, determinan las propiedades físicas y organolépticas de muchos alimentos. Así, la consistencia y textura de la carne, leche, queso o pan, dependen en gran medida de la naturaleza de las proteínas que los constituyen. Pero también, en alimentos elaborados con una presencia menor de proteínas pueden jugar un papel muy importante, influyendo en características funcionales, como la absorción de agua o aceite o la formación de emulsiones, geles y espumas (Za-

yas, 1997). Además, las proteínas también constituyen un aporte nutricional importante, representando una fuente de energía, nitrógeno y amino ácidos esenciales (Cheftel *et al.*, 1989).

En los últimos años, el estudio de las proteínas de los alimentos como componentes beneficiosos, no sólo desde un punto de vista funcional o nutricional, está recibiendo una gran atención. En este sentido, se viene investigando la presencia de péptidos bioactivos en proteínas de diversos alimentos (Kitts, 1993; Schlimme y Meisel, 1995; Meisel, 1997; Yamamoto, 1997; Korhonen *et al.*, 1998). Los péptidos bioactivos son secuencias de amino ácidos de pequeño tamaño, entre 2 y 15 residuos, inactivas dentro de la proteína intacta pero que pueden ser liberados bien durante la digestión del alimento en el organismo del individuo o por un procesado previo del mismo, como por ejemplo mediante hidrólisis enzimática. Estos péptidos tendrían efectos beneficiosos para el organismo en diversos casos. Así pues, las características nutricionales de una proteína determinada no se limitarían sólo al aporte de N y energía que contiene, así como a los contenidos en amino ácidos esenciales, sino también habría que considerar la actividad de péptidos bioactivos que pueden ser liberados de estas proteínas durante el procesado del alimento o la digestión gastrointestinal ejerciendo diversas funciones metabólicas.

A continuación se exponen los principales péptidos bioactivos descritos hasta el momento y sus efectos fisiológicos.

PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD OPIOIDE

Se ha descrito la existencia de péptidos derivados de proteínas alimentarias con actividad opioide. El aislamiento por primera vez en 1975 de péptidos opioides endógenos denominados encefalinas, condujo a la detección en 1979 de la actividad opioide de péptidos derivados de hidrolizados proteicos de las proteínas de la leche (Brantl *et al.*, 1979; Henschen *et al.*, 1979). Estos son péptidos pequeños, entre 5 y 10 amino ácidos de longitud. Los más abundantes son las β -casomorfina denominadas

así por derivar de la hidrólisis de la β -caseína y por su parecido efecto fisiológico al de la morfina (Teschmacher y Koch, 1991). Otros péptidos bioactivos aislados, aunque con menor actividad opioide, son las exorfinas generadas a partir de la hidrólisis de la α -caseína, las α -lactorfinas derivadas de la α -lactoalbumina y las β -lactorfinas provenientes de la hidrólisis de la β -lactoglobulina (Schanbacher *et al.*, 1998).

La característica común en la secuencia aminoacídica de todos estos péptidos es la presencia de un residuo de Tirosina en el extremo N-terminal así como la presencia de otro residuo aromático (Phe o Tyr) en la tercera o cuarta posición del péptido (Fiat *et al.*, 1993).

Se ha observado en ratas (Daniel *et al.*, 1993) y perros (Defilippi *et al.*, 1995) que las casomorfina afectan la función gastrointestinal inhibiendo la tasa de vaciado gástrico y la motilidad intestinal y por lo tanto ralentizando el paso del alimento a través del tracto intestinal. También se ha descrito la presencia en el organismo de mujeres lactantes de β -casomorfina generadas a partir de β -caseína de la propia glándula mamaria y se ha sugerido que pueden producir cambios neurológicos en dichas mujeres (Nyberg *et al.*, 1989, Turner *et al.*, 1991).

Otras funciones propuestas para estos péptidos es la de ejercer una acción antidiarreica o modular el transporte intestinal de aminoácidos (Meisel, 1998).

PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD OPIOIDE ANTAGONISTA

Se ha descrito también la existencia de péptidos derivados de la hidrólisis de la leche capaces de antagonizar la actividad de los péptidos opioides descritos anteriormente (Yoshikawa *et al.*, 1988; Chiba *et al.*, 1989, Yoshikawa *et al.*, 1994, Schanbacher *et al.*, 1998). Los principales son las casoxinas, derivadas de la proteólisis de la κ -caseína y las lactoferroxinas generadas a partir de la hidrólisis del lactoferrina (Creamer *et al.*, 1996, Nuijens *et al.*, 1996, Schlimme *et al.*, 1995).

PÉPTIDOS INMUNOMODULADORES

Se ha observado que péptidos derivados de la hidrólisis de la α -caseína y la β -caseína son capaces de estimular la fagocitosis de eritrocitos por macrófagos del peritoneo así como ejercer un efecto protector frente a infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* tras su administración intravenosa en ratones (Parker *et al.*, 1984; Migliore-Samour *et al.*, 1989). Así mismo se ha descrito que la secuencia C-terminal de la β -caseína de vaca (que incluye a una β -casoquinina) induce una proliferación significativa

de linfocitos de ratas (Coste *et al.*, 1992). También, recientemente Kayser y Meisel (1996) han descrito que la inmunoreactividad de linfocitos humanos era estimulada por varios péptidos bioactivos de proteínas de leche. Así, los péptidos Tyr-Gly y Tyr-Gly-Gly correspondientes a fragmentos de la α -lactoalbumina y la κ -caseína de vaca respectivamente incrementaban significativamente la proliferación de linfocitos. Sin embargo, el mecanismo por el cual estos péptidos ejercen el mecanismo inmunomodulador no es bien conocido (Meisel, 1998).

PÉPTIDOS TRANSPORTADORES DE IONES

También conocidos como caseinofosfopéptidos son fosfopéptidos que pueden formar sales solubles organofosforadas y funcionar como transportadores de diferentes minerales, especialmente calcio y también hierro (Sato *et al.*, 1986, Kitts y Yuan, 1992). Se ha sugerido que estos péptidos pueden tener un efecto anticariogénico al inhibir la formación de caries a través de la recalcificación del diente (Reynolds, 1987).

PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA O CASOPLATELINAS

Estos péptidos son derivados del extremo C-terminal de la κ -caseína bovina. Presentan actividad inhibidora de la agregación de plaquetas así como de la unión de la cadena γ del fibrinógeno humano a receptores específicos de la plaqueta (Jollés *et al.*, 1986). Los principales péptidos antitrombóticos de la κ -caseína son los correspondientes a la secuencia aminoacídica Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Glu-Asp-Lys, correspondiente a los aminoácidos 106 a 116. También tienen actividad los fragmentos menores 106-112, 112-116 y 113-116 (Bouhallab *et al.*, 1992). Los residuos Ile₁₀₈, Lys₁₁₂ y Asp₁₁₅ parecen ser importantes en el efecto inhibidor que es debido a la competencia entre los péptidos y la cadena γ por el receptor de la plaqueta (Fiat *et al.*, 1989).

PÉPTIDOS INHIBIDORES DEL ENZIMA CONVERTIDOR DE LA ANGIOTENSINA

La función más conocida y extendida de los péptidos bioactivos aislados hasta ahora es la de inhibición del enzima convertidor de angiotensina (ECA) (Skeggs *et al.*, 1956). Este enzima es una Zn-metalopeptidasa que se expresa como un ectoenzima unido a membrana en células endoteliales, fundamentalmente del sistema vascular. Por un lado, actúa incrementando la presión sanguínea al hidrolizar el decapeptido angiotensina I en el octapéptido vasoconstrictor angiotensina II. Por otro también inhibe el

nonapéptido bradiquinina que es un potente vasodilatador (Erdos 1975). Esta peptidasa se encuentra localizada en múltiples zonas del organismo, como pulmón, riñón, corazón, músculos, páncreas, cerebro, arterias, útero e intestino (Ariyoshi, 1993). Los péptidos inhibidores de ECA son de pequeño tamaño, muchos di y tripéptidos, que son absorbidos fácil y rápidamente en el estómago e intestino. Pueden entrar en el sistema circulatorio e inhibir esta peptidasa, lo cual genera una bajada de la presión arterial. En este sentido, ya que la hipertensión está relacionada directamente con las enfermedades coronarias estos péptidos van a reducir los riesgos de generación de este tipo de enfermedades (Takano 1998). Así, se han realizado ensayos de inhibición «in vitro» de la ECA (Nakamura *et al.*, 1995), pero también «in vivo», donde se ha observado que ratas hipertensas ven reducidas su presión arterial tras la ingesta de péptidos inhibidores de ECA (Maruyama *et al.*, 1985; Suetsuna y Osajima, 1989; Yamamoto *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1996), demostrándose de esta forma el carácter beneficioso de su ingesta.

Péptidos inhibidores de ECA fueron aislados por primera vez en 1979 de un hidrolizado de gelatina obtenido con colagenasa (Oshima *et al.*, 1979). Desde entonces han sido encontrados en proteínas de leche fundamentalmente, y conocidos como casoquininas (Meisel *et al.*, 1997; Takano, 1998). Aunque también se han descrito en proteínas de pescados (Yokoyama *et al.*, 1992) y levaduras (Ariyoshi, 1993; Yamamoto, 1997) así como en las proteínas de almacén del maíz (Miyoshi *et al.*, 1991) y el arroz (Muramoto y Kawamura, 1991).

Como hemos visto, la mayoría de estos péptidos han sido estudiados en las proteínas de la leche, mientras que los estudios en otras fuentes proteicas, como las vegetales son prácticamente inexistentes.

Otro factor importante es que algunos péptidos bioactivos realizan más de una función. Así ciertos péptidos pueden ser opioides y también presentar actividad inhibidora de la angiotensina. Esto ha llevado a la descripción de «zonas estratégicas» en las secuencias de las proteínas de almacén, es decir, regiones concretas de una proteína que serían más ricas en fragmentos aminoacídicos con propiedades bioactivas (Schlimme y Meisel, 1995).

En los últimos años, el aprovechamiento de proteínas de fuentes no convencionales está recibiendo un enorme impulso (Altschul, 1974). En este sentido, caben destacar los estudios que se vienen realizando para el aprovechamiento de las proteínas del girasol y la colza tras la extracción del aceite (Parrado *et al.*, 1991, Bautista *et al.*, 1996, Dev y Mukherjee, 1986, Villanueva *et al.*, 1999; Vioque *et al.*, 1999). Tras la extracción industrial de este aceite queda la harina desengrasada o torta, con unos contenidos importantes de proteína que podrían ser aprovecha-

dos. Estas proteínas de plantas oleaginosas son extraídas mediante su solubilización a pH básico y posterior precipitación en su punto isoelectrico, obteniéndose un aislado proteico, con un contenido en proteínas superior al 90%. Sin embargo, dicho aislado presenta una baja solubilidad que limita su aplicación en la elaboración de muchos alimentos. Una posibilidad para mejorar esta y otras propiedades funcionales es la generación de un hidrolizado proteico. Estos hidrolizados presentan mejores características con respecto a las proteínas originales, desde un punto de vista funcional, como mayor solubilidad, pero también desde un punto de vista nutricional como es su mayor y más rápida tasa de absorción en el tracto digestivo (Frokjaer, 1994). De esta forma se incrementa el valor de residuos como la harina desengrasada de colza o girasol. Pero estos hidrolizados proteicos pueden presentar un valor añadido si entre los péptidos que se generen por la acción de las proteasas los hay con actividad bioactiva. En este sentido, se hace necesaria la realización de ensayos preliminares *in vitro* para determinar la posible presencia de péptidos bioactivos en hidrolizados proteicos de origen vegetal, principalmente girasol y colza, y que podrían incrementar el valor añadido de estos hidrolizados, así como en el futuro permitir la generación de hidrolizados vegetales muy específicos, como por ejemplo enriquecidos en péptidos opioides, antitrombóticos, etc. De hecho, se han obtenido enriquecidos en fosfopéptidos de caseína mediante hidrólisis enzimática y posterior purificación por cromatografía de intercambio iónico (Kunst, 1992). También se han obtenido β -casomorfina mediante ingeniería genética seguida por digestión enzimática de la proteína recombinante para liberar los péptidos requeridos (Carnie *et al.*, 1989). Por último, se han usado sistemas de ultrafiltración por membrana para la obtención de permeatos enriquecidos en péptidos con actividad antitrombótica (Bouhallab *et al.*, 1992).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado gracias al proyecto de investigación ALI 98-0766.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, A.M. (1974) en—«New protein foods».—Vol. 1º, Academic Press, New York.
- Ariyoshi, Y. (1993).—«Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins».—*Trends in Food Science & Technology* 4: 139-144.
- Bautista J., Hernández-Pinzón, I., Alaiz, M., Parrado J. y Millán F. (1996).—«Low molecular weight sunflower protein hydrolysate with low concentration in aromatic amino acids».—*J. Agric. Food Chem.* 44, 967-971.
- Bouhallab, S., Mollé, D. y Léonil, J. (1992).—«Tryptic hydrolysis of caseinomacropeptide in membrane reactor: preparation of bioactive peptides».—*Biotechnology Letters* 14, 805-810.

- Brantl, V., Teschemacher, H., Henschen, A. y Lottspeich, F. (1979).—«Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone».—*Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **360**, 1211-1216.
- Carnie, J., Minter, S., Oliver, S., Perra, F., y Metzloff, M. (1989).—«Nutritional compositions containing β -casomorphins».—UK Patent Application GB 2214810 A.
- Cheffel, J.C., Cuq, J.L. y Lorient D. (1989).—«Proteínas Alimentarias».—Ed. Acribia S.A., Zaragoza (España).
- Chiba, H., Tani, F. y Yoshikawa, M. (1989).—«Opioid antagonist peptides derived from κ -casein».—*Journal of Dairy Research*, **56**, 363-366.
- Coste, M., Rochet, V., Léonil, J., Mollé, D., Bouhallab, S. y Tomé, D. (1992).—«Identification of C-terminal peptides of bovine β -casein that enhance proliferation of rat lymphocytes».—*Immunological Letters*, **33**, 41-46.
- Creamer, L. K. y MacGibbon, A. K. H. (1996).—«Some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids».—*International Dairy Journal*, **6**, 539-568.
- Daniel, H., Vohwinkei, H. y Rehner, G. (1993).—«Effect of casein and β -casomorphins on gastrointestinal motility in rats».—*Journal of Nutrition*, **120**, 252-257.
- Defilippi, C., Gómez, E., Charlin, V. y Silva, C. (1995).—«Inhibition of small intestinal mobility by casein: a role of β -casomorphins?».—*Nutrition*, **11**, 751-754.
- Dev, D.K. y Mukherjee K.D. (1986).—«Functional properties of rapeseed protein products with varying phytic acid contents».—*J. Agric. Food Chem.*, **34**, 775-780.
- Erdos, E. G. (1975).—«Angiotensin-I converting enzyme».—*Circulation Research* **36**, 247-255.
- Fiat, A. M., Levy-Toledano, S. Caen, J.P. and Jollés, P. (1989).—«Biologically active peptides of casein and lactotransferrin implicated in platelet function».—*Journal of Dairy Research*, **56**, 351-355.
- Fiat, A.M., Migliore-Samour, D., y Jollés, P. (1993).—«Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities».—*Journal of Dairy Science*, **76**, 301-310.
- Frokjaer, b. (1994).—«Use of hydrolysates for protein supplementation».—*Food Technology*, **48**, 86-88.
- Henschen, A., Lottspeich, F., Brantl, V. y Teschemacher (1979).—«Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). II. «Structure of active components from bovine casein peptone».—*Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, **360**, 1217-1224.
- Jolles, P., Lévy-Toledano, S., Fiat, A.M., Soria, C., Gillessen, D., Thomaidis, A., Dunn, F. W. y Caen, J. B. (1986).—«Analogy between fibrinogen and casein».—*European Journal of Biochemistry*, **158**, 379-384.
- Kayser, H. y Meisel, H. (1996).—«Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins».—*FEBS Letters*, **383**, 18-20.
- Kitts, D.D. (1993).—«Bioactive substances in food: identification and potential uses».—*Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **72**, 423-434.
- Kitts, D. D. y Yuan, Y. V. (1992).—«Caseinophosphopeptides and calcium bioavailability».—*Trends in Food Science and Technology*, **3**, 31-35.
- Korhonen, H. Pihlanto-Leppälä, A., Rantamäki, P. y Tupasela, T. (1998).—«Impact of processing on bioactive proteins and peptides».—*Trends in Food Science & Technology*, **9**, 307-319.
- Kunst, A. (1992).—«Process to isolate phosphopeptides».—*European Patent Application*, 0 467 199 A.
- Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N. y Suzuki, H. (1985).—«Angiotensin-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats».—*Agricultura and Biological Chemistry*, **49**, 1405-1409.
- Meisel, H. (1997).—«Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins».—*Biopolymers*, **43**, 119-128.
- Meisel, H. (1998).—«Overview on milk protein-derived peptides».—*International Dairy Journal*, **8**, 363-373.
- Meisel, H., Goepfert, A. y Günther, S. (1997).—«Occurrence of ACE inhibitory peptides in milk products».—*Milchwissenschaft*, **52**, 307-311.
- Migliore-Samour, D., Floch, F. y Jolles, P. (1989).—«Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation».—*Journal of Dairy Research*, **56**, 357-362.
- Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H. y Maruyama, S. (1991).—«Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an alpha-zein hydrolysate».—*Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1313-1318.
- Muramoto, M. y Kawamura, Y. (1991).—«Properties of rice proteins and angiotensin-converting enzyme-inhibiting peptides from proteins».—*Shokuhin Kogyo*, **34**, 18-26.
- Nakamura, Y., Masuda, O. y Takano, T. (1996).—«Decrease of tissue angiotensin-I-converting enzyme activity upon feeding sour milk in spontaneously hypertensive rats».—*Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **60**, 488-489.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S. y Takano, T. (1995).—«Purification and characterization of angiotensin-I-converting enzyme inhibitors from a sour milk».—*Journal of Dairy Science*, **78**, 777-783.
- Nuijens, J. H., van Berkei, P.H.C. y Schanbacher, F.L. (1996).—«Structure and biological actions of lactoferrin».—*Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia*, **1**, 285-294.
- Nyberg, F., Lieberman, H., Lindström, L. H., Lyrenäs, S., Koch, G. y Terenius, L. (1989).—«Immunoreactive β -casomorphin 8 in cerebrospinal fluid from pregnant and lactating women: correlation with plasma levels».—*Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **68**, 283-289.
- Oshima, G., Shimabukuro, H. y Nagasawa, K. (1979).—«Peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase».—*Biochemical et Biophysica Acta*, **566**, 128-137.
- Parker, F., Migliore-Samour, D., Floch, F., Zerial, A., Werner, G.H., Jolles, J., Casaretto, M., Zahn, H. y Jolles, P. (1984).—«Immunostimulating hexapeptide from human casein: amino acid sequence, synthesis and biological properties».—*European Journal of Biochemistry*, **145**, 677-682.
- Parrado, J., Bautista, J. y Machado, A. (1991).—«Production of soluble enzymatic protein hydrolysate from industrially defatted dehulled sunflower meal».—*J. Agric. Food Chem.*, **39**, 447-450.
- Reynolds, E. (1987).—«Phosphopeptides».—PCT International Patent Application WO 87/07615 A1.
- Sato, R., Naguchi, T., y Naito, H. (1986).—«Casein phosphopeptide (CPP) enhance calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine».—

- Journal of Nutrition Science and Vitaminology*, **32**, 67-76.
- Schanbacher, F. L., Talhouk, R. S., Murray, F. A., Gherman, L.I. y Willett, L. B. (1998).—«Milk-borne bioactive peptides».—*Int. Dairy Journal*, **8**, 393-403.
- Schlimme, E. y Meisel, H. (1995).—«Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects».—*Die Nahrung*, **39**, 1-20.
- Skeggs, L.T., Kahn, J.E. y Shumway, N.P. (1956).—«The preparation and function of the angiotensin-converting enzyme».—*Journal of Experimental Medicine*, **103**, 295-299.
- Suetsuna, K. y Osajima, K. (1989).—«Blood pressure reduction and vasodilatory effects in vivo of peptides originating from sardine muscle».—*Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science*, **42**, 47-54.
- Takano, T. (1998).—«Milk derived peptides and hypertension reduction».—*International Dairy Journal*, **8**, 375-381.
- Teschemacher, H. y Koch, G. (1991).—«Opioids in the milk».—*Endocrine Regulation*, **25**, 147-150.
- Turner, J. D. y Huynh, H. T. (1991).—«Role of tissue remodeling in mammary epithelial cell proliferation and morphogenesis».—*Journal of Dairy Science*, **74**, 2801-2807.
- Villanueva, A., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Vioque, J., Bautista, J. y Millán, F. (1999).—«Production of an extensive sunflower protein hydrolysate by sequential hydrolysis with endo- and exo-proteases».—*Grasas y Aceites*, **50**, 472-476.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J. y Millán, F. (1999).—«Production and characterization of an extensive rapeseed protein hydrolysate».—*Journal of the American Oil Chemists Society*, **76**, 819-823.
- Yamamoto, N. (1997).—«Antihypertensive peptides derived from food proteins».—*Biopolymers*, **43**, 129-134.
- Yamamoto, N., Akino, A. y Takano, T. (1994).—«Antihypertensive effects of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertension rats».—*Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **58**, 776-778.
- Yokoyama, K., Chiba, H., and Yoshikawa, M. (1992).—«Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito».—*Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1541-1545.
- Yoshikawa, M., Tani, F. y Chiba, H. (1988).—«Structure-activity relationship of opioid antagonist peptides derived from milk proteins».—In *Peptide Chemistry*, ed. T. Shiba. Protein research Foundation, Osaka, pp. 473-476.
- Yoshikawa, M., Tani, F., Shiota, H., Usui, H., Kurahashi, K. y Chiba, H.D. (1994).—«Casoxin D, an opioid antagonist/ileum-contracting/vasorelaxing peptide derived from human α_{s1} -casein».—In β -Casomorphins and related peptides: recent developments, eds. V. Brantl and H. Teschemacher. VCH, Weinheim, pp. 43-48.
- Zayas, J. F. (1997).—«Functionality of proteins in food».—Springer-Verlag, Berlin (Germany).

Recibido: Junio 1999
Aceptado: Octubre 1999