

Efecto hipotensivo de proteínas hidrolizadas obtenidas del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) endurecido

Durán-Rodríguez, Ana Cecilia*, Barbosa-Martín Enrique Efraín**, Figueroa-González, Adriana Regina**, Ruiz-Ruiz Jorge Carlos***, Betancur-Ancona David Abraham***, Chel-Guerrero Luis Antonio***

Resumen

Al ser el entorno uno de los detonantes de las manifestaciones clínicas propias de la hipertensión arterial sistémica, los científicos se han dado a la tarea de plantear nuevas soluciones que sustituyan los fármacos utilizados en el tratamiento de esta enfermedad. Las proteínas alimentarias se investigan no solo desde el punto de vista nutrimental, sino como materia prima para la obtención de péptidos con funciones biológicas específicas y entre ellos se encuentran algunos que poseen actividad antihipertensiva por inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA-I). Se realizó un estudio analítico, experimental, prospectivo y transversal para evaluar el efecto hipotensor de las fracciones peptídicas obtenidas del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) endurecido en ratas Wistar Kyoto; las mediciones de la presión arterial se realizaron del 25 de julio al 19 de agosto del año 2011 en el bioterio de la Facultad de Ingeniería Química (FIQ) de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY). Resultados. De la dieta experimental adicionada con 5 mg/Kg de péptidos obtenidos por hidrólisis con el sistema pepsina-pancreatina se obtuvo una presión arterial sistólica de 97 mmHg y una presión arterial diastólica de 63 mmHg comparables con los valores de presión obtenidas de las dietas con Captopril®. Los resultados establecen bases para considerar a las fracciones peptídicas de los hidrolizados de frijol endurecido como ingredientes nutraceuticos, con potencial para ser empleados en el desarrollo de alimentos funcionales. LUX MÉDICA, AÑO 7, NÚMERO 22, SEPTIEMBRE-DICIEMBRE 2012 PP 51-58

Abstract

Being the environment one of the triggers of the clinical manifestations of systemic arterial hypertension, scientists have given the task of raising new solutions that replace the drugs used in the treatment of this disease. Food proteins are investigated not only from the nutritional point of view, but as raw material for the production of peptides with specific biological functions and among them there are some possessing antihypertensive activity by inhibition of the enzyme angiotensin-converting enzyme (ACE-I). An analytical, experimental, prospective and cross-sectional study was conducted to evaluate the effect of antihypertensive peptide derived from the bean fractions (*Phaseolus vulgaris* L.) hardened in Wistar Kyoto rats; blood pressure measurements were taken from July 25 to August 19, the year 2011 in the Bioregion of the Faculty of engineering Chemistry (FEQ) of the Universidad Autónoma of Yucatan (UAY). Results. The experimental diet added with 5 mg/Kg of peptides obtained by hydrolysis with the system pepsina-pancreatina was comparable with the values of pressure 97 mmHg systolic blood pressure and diastolic blood pressure of 63 mmHg obtained diets with Captopril®. The results establish bases to consider fractions peptide of the hydrolysates of bean hardened as ingredients nutraceuticals, with potential to be used in the development of functional foods. LUX MÉDICA, AÑO 7, NÚMERO 22, SEPTIEMBRE-DICIEMBRE 2012 PP 51-58

Palabras clave: Hipertensión arterial sistémica, proteínas alimentarias, péptidos, ECA-I

Key words: systemic hypertension, dietary proteins, peptides, ACE-I

* Estudiante de la Licenciatura de Nutrición del Departamento de Nutrición Cultura Física y Deporte del Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

** Estudiantes de la Licenciatura en Nutrición, Universidad Autónoma de Yucatán

*** Profesores investigadores de la Facultad de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Yucatán.

Correspondencia Dr. Luis Antonio Chel Guerrero. Facultad de Ingeniería Química UADY. Periférico Norte Km. 33.5, Tablaje Catastral 13615, Colonia Chuburná de Hidalgo Inn, C.P. 97203. Yucatán, Mérida, México. Teléfono: +52 (999) 946-0956. Correo electrónico: cguerrer@uady.mx

Introducción.

La hipertensión es un aumento de la resistencia periférica total debido a vasoconstricción de la pared vascular arteriolar, que conduce a un aumento de la presión sistémica¹. Existen sistemas hormonales que ayudan a la regulación de la presión arterial y el flujo sanguíneo; de estos el más importante es el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAA). Ante una caída de la presión arterial, la renina secretada por las células yuxtglomerulares del riñón convierte el angiotensinógeno en angiotensina². En secuencia la renina y la enzima convertidora de angiotensina (ECA) actúan sobre sus sustratos para producir la hormona activa angiotensina II, la cual eleva la presión arterial³.

En México y en el mundo, la hipertensión arterial (HTA) es un problema de salud pública que afecta a gran parte de la población, principalmente adulta⁴. Al ser el entorno uno de los detonantes de las manifestaciones clínicas propias de la enfermedad, es posible plantear tratamientos alternos y sencillos de realizar; como un control de la dieta y la realización de actividad física⁵. Es en esta búsqueda que los científicos se han dado a la tarea de plantear otras alternativas en el tratamiento de esta enfermedad. Actualmente, las proteínas alimentarias se investigan no solo desde el punto de vista nutrimental o funcional, sino como materia prima para la obtención de péptidos⁶. Los péptidos bioactivos son cadenas de entre 2 y 20 aminoácidos que componen proteínas y se encuentran inactivas en la proteína intacta.⁷ Una vez liberados mediante hidrólisis química o enzimática, los péptidos con actividad biológica, tienen efectos específicos destacando los del aparato digestivo, el sistema cardiovascular (antihipertensivos, antitrombóticos), defensa del organismo (antimicrobianos) y otros como el efecto antioxidante; lo que justifica su uso como nutracéuticos en alimentos funcionales.⁸ Actualmente existe una gran gama de péptidos con funciones biológicas específicas y entre ellos se encuentran algunos que poseen actividad antihipertensiva al inhibir a la enzima convertidora de angiotensina (ECA-I)⁹. La ECA-I es la enzima encargada de hidrolizar a la angiotensina I (derivada del angiotensinógeno por acción de la renina) para formar la angiotensina II, que es la hormona activa responsable de disminuir la filtración glomerular y aumentar la reabsorción de sodio y cloro. Además, esta enzima degrada la bradiginina, que es un péptido vasodilatador; elevando así la presión arterial. Es por lo anterior que la inhibición de la ECA-I es crucial para el control de la hipertensión arterial.¹⁰

Se han realizado diversos estudios tanto "in vitro" como "in vivo" para lograr la comprensión del mecanismo de acción de los péptidos que inhiben la ECA. Dicho mecanismo es similar a la de los fármacos, ya que los tres últimos residuos de aminoácidos adyacentes a la región del C-terminal, de los péptidos que presentan esta actividad, se enlazan fuertemente al sitio activo de la ECA y se ha

observado que éstos tienen una mayor especificidad de inhibición hacia aquellos péptidos que contengan residuos de aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos o ramificados) en las tres últimas posiciones de la región C-terminal. Lo anterior, aplica para los péptidos de cadenas cortas altamente activos como son: la mayoría de los di y tripéptidos que poseen residuos de tirosina (Y), fenilalanina (F), triptófano (W), o prolina (P) en el C-terminal, siendo el W el que parece ser que le confiere mayor potencial de inhibición de la ECA. Con respecto, a los residuos de aminoácidos que más predominan en el grupo N-terminal de los di y tripéptidos son la isoleucina (I) y la valina (V)¹¹. Cheung y col¹² reportaron que la actividad inhibitoria de la ECA es más fuerte cuando hay residuos de aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos y ramificados) como la histidina-leucina (HL), fenilalanina-arginina (FR) y alanina-prolina (AP) en el C-terminal.

Puede resumirse el mecanismo de acción de los péptidos en dos puntos relevantes: 1) tienen importancia fisiológica, porque en la administración oral, estos péptidos bioactivos tienen que alcanzar el torrente sanguíneo en una forma activa para ejercer su efecto antihipertensivo, ya que la digestión gastrointestinal y el transporte son las principales barreras de la biodisponibilidad de los péptidos que inhiben a la ECA y 2) la digestión por proteasas gastrointestinales pueden ser usados como un proceso de producción de péptidos inhibitorios de la ECA, con la ventaja de que los péptidos que se formen sean resistentes a la digestión fisiológica después de su ingestión¹³. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto hipotensor *in vivo* de fracciones peptídicas obtenidas por hidrólisis enzimática de concentrados proteínicos de frijol endurecido en un modelo animal.

Material y métodos

Se trata de un estudio de tipo analítico, experimental, prospectivo y transversal, desarrollado en el Laboratorio de Ciencia de los Alimentos y en el bioterio de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, durante el periodo comprendido entre el 25 de Junio y el 19 de Agosto del año 2011, como producto de una estancia denominada "Verano de la Investigación".

Se efectuaron dos hidrólisis enzimáticas usando los sistemas secuenciales Alcalasa® Flavourzyme® (AF), de acuerdo al método descrito por Pedroche et al.¹⁴ y Pepsina-

Pancreatina (PP), con el método propuesto por Vioque et al.¹⁵ Para ambos sistemas, se usó como sustrato un concentrado proteínico de frijol endurecido (*Phaseolus vulgaris* L.) con un contenido de proteína cruda de 67.7%. Posteriormente se obtuvieron cinco fracciones peptídicas de la porción soluble de ambos hidrolizados, usando celdas de ultrafiltración de diferente corte de peso molecular (10, 5, 3 y 1 kDa), empleando la metodología de Cho et al¹⁶. A cada una de las fracciones se les cuantificó el contenido de proteína soluble, mediante el método de Lowry¹⁷, y se determinó el porcentaje de inhibición de la Enzima Convertidora de

Angiotensina-I (ECA). A las fracciones que presentaron el mayor porcentaje de inhibición de la ECA se les determinaron los valores de IC₅₀, (concentración de fracción hidrolizada necesaria para inhibir en un 50% la actividad de la ECA), mediante el método de Hayakary et al¹⁸. Para efectuar los estudios *in vivo* se seleccionaron las fracciones peptídicas de < 1 kDa y se evaluaron durante cuatro semanas en 21 ratas hembras normotensas de la raza Wistar Kyoto, lo anterior fue debido a que el objetivo era observar el efecto de los hidrolizados y fracciones peptídicas sobre la disminución de la presión arterial en dichos animales de experimentación, asignando al azar tres ratas con un peso promedio de

250g para cada tratamiento. En total, para los tratamientos, se probaron siete dietas experimentales: una dieta control, dos dietas incorporadas con dos niveles del fármaco Captopril (5 y 10 mg/kg de peso) y cuatro dietas incorporadas con dos niveles de cada una de las fracciones peptídicas AF y PP (5 y 10 mg/kg de peso). La evaluación consistió en la medición de la presión arterial de los animales durante cuatro semanas, del 25 de Julio al 19 de Agosto del año 2011 en el Bioterio de la Facultad de Ingeniería Química (FIQ) de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) empleando el sistema CODA™ de medición arterial no invasiva y para el análisis estadístico se emplearon medidas de tendencia central.

Resultados

De la ultrafiltración se obtuvieron cinco fracciones de diferentes pesos moleculares, para ambos sistemas enzimáticos (AF y PP): F >10 kDa, F 5 - 10 kDa, F 3 - 5 kDa, F 1 - 3 kDa y F <1 kDa. Se observó que el contenido de proteína disuelta en las fracciones disminuyó de forma proporcional conforme se redujo el peso molecular de la membrana de ultrafiltración empleada

(figura 1). Se determinó *in vitro* el porcentaje de inhibición de la ECA a cada una de las fracciones de cada sistema, de manera general se observó que el porcentaje de inhibición se incrementó al disminuir el peso molecular de la fracción; observándose los mayores porcentajes de inhibición en las fracciones de <1 kDa. Los valores de IC₅₀, de las fracciones de <1 kDa se presentan en la figura 2.

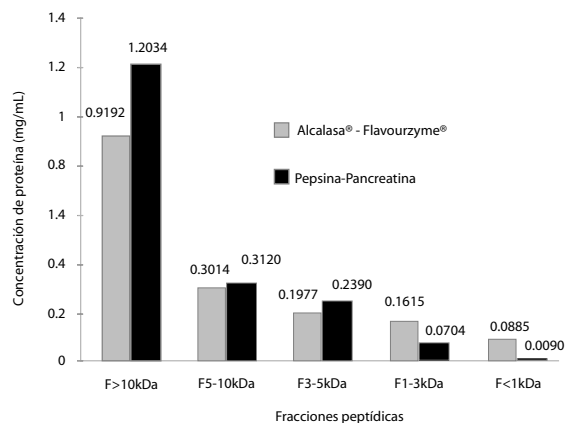


Figura 1. Concentración de proteína (mg-ml) de las fracciones peptídicas de AP y PP.

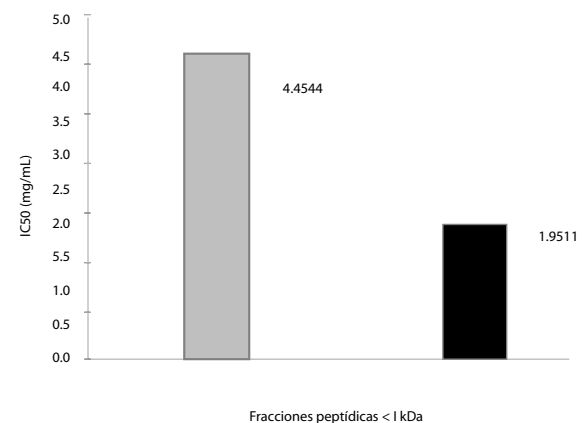


Figura 2. Valores de IC en las fracciones <1kDa de los sistemas enzimáticos de AP y PP.

La composición de las dietas experimentales se muestra en las tablas 1 y 2. Los datos obtenidos de la evaluación *in vivo* del efecto hipotensor de las fracciones de <1 kDa obtenidas con ambos tratamientos enzimáticos se presentan en las figuras 3 y 4. La fracción de <1 kDa obtenida con el sistema enzimático PP ejerció un mayor

efecto hipotensor a los dos niveles evaluados (5 y 10 mg/kg de peso), ya que no solo reduce ambas presiones (diastólica y sistólica), sino que dicha reducción fue más estable durante el tiempo del estudio.

El efecto hipotensor de dicha fracción, incluso fue semejante al que presentó el fármaco Captopril a los dos niveles evaluados.

| Ingrediente | gr/1.5Kg |
|--------------------------|------------------|
| Caseína | 150.00 |
| Glucosa (destrosa) 78.5% | 286.62 |
| Almidón de maíz | 1003.00 |
| Aceite de maíz | 75 |
| Celulosa | 30 |
| Mezcla de vitaminas | 7.5 |
| Mezcla de minerales | 9.0 |
| Total | 1561.62gr |

Tabla 1. Composición de las dietas experimentales

| Tratamiento | Concentración |
|------------------------|----------------------------|
| Alcalase®-Flavourzyme® | 5mg/kg de peso de la rata |
| Alcalase®-Flavourzyme® | 10mg/kg de peso de la rata |
| Pepsina-Pancreatina | 5mg/kg de peso de la rata |
| Pepsina-Pancreatina | 10mg/kg de peso de la rata |
| Captopril | 5mg/kg de peso de la rata |
| Captopril | 10mg/kg de peso de la rata |
| Blanco negativo | -- |

Tabla 2. Niveles de adicción a las dietas experimentales

La evaluación *in vivo* se determinó durante cuatro semanas, haciendo mediciones dos veces por semanas. En total se obtuvieron siete mediciones, observándose un mayor descenso de la presión arterial sistólica (PAS) en las ratas tratadas con 5 mg/kg de peso del sistema AF (figura 3). Respecto a la presión arterial diastólica (PAD), se ob-

servó un mayor descenso de la presión en las ratas tratadas con 10 mg/kg de peso del sistema PP (figura 4). Al comparar las medias de las PAS y PAD de todos los tratamientos puede observarse que todas, sin excepción, son inferiores en comparación de la media correspondiente al tratamiento blanco negativo (sin adicionar) (figura 5).

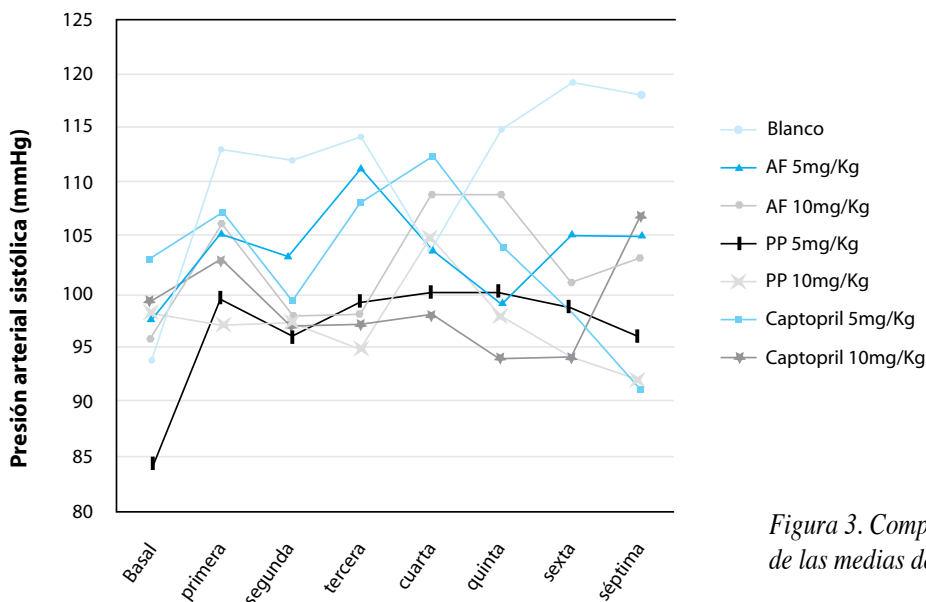


Figura 3. Comparación de las medias de la PAS.

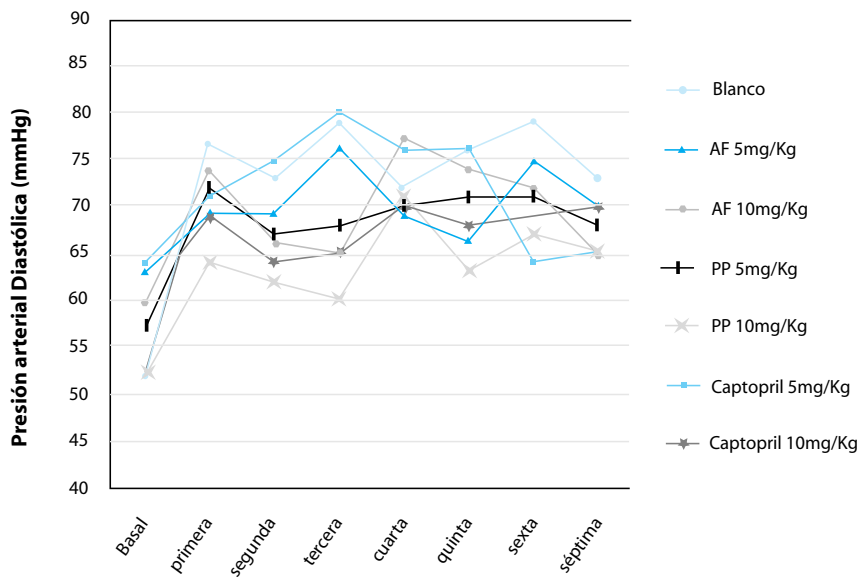


Figura 4. Comparación de las medias de las PAD.

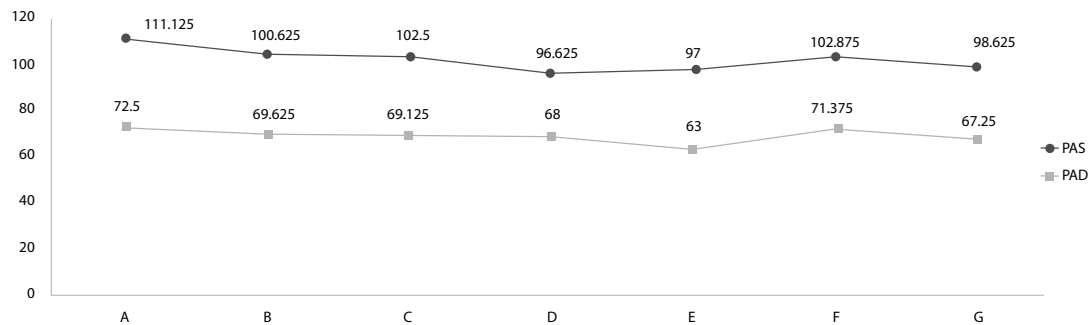


Fig 5. Comparación de las medias de las presiones arteriales de todos los tratamientos. A: Blanco negativo. B: Alcalase "Flavourzyme" 5mg:kg peso. C: Alcalase "Flavourzyme" 10 mg:Kg peso. D: Pepsina-Pancreatina 10mg Kg peso. F: Captopril 5mg:Kg peso y G: Captopril 10 mg:Kg peso

Discusión

La presente investigación evaluó el efecto hipotensor *in vivo* de las fracciones peptídicas obtenidas por hidrólisis enzimática de concentrados proteínicos de frijol endurecido las cuales se adicionaron al alimento que se elaboró para los animales del ensayo. Se observó en ambos hidrolizados, que la actividad inhibitoria (AI) de ECA *in vitro* de las fracciones peptídicas ultrafiltradas depende del peso molecular de los péptidos, con la menor AI en la fracción de >10kDa y la más alta en las fracciones de menor peso. Esto concuerda con las obser-

vaciones que muestran que los péptidos de bajo peso molecular muestran más actividad inhibitoria de ECA.¹⁹

Los valores de IC50 (cantidad de proteína requerida para inhibir el 50% de la actividad de la ECA) fueron de 4.45 µg/mL y de 1.95 µg/mL para los sistemas AF y PP, respectivamente lo cual indicaría que los péptidos preparados con el sistema pepsina-pancreatina son más efectivos para el tratamiento de la presión arterial.

Para la realización de las dietas experimentales se utilizaron las fracciones de peso molecular <1kDa de Alcalase®-

Flavourzyme(r) y fracción <1kDa de Pepsina-Pancreatina, estos tratamientos fueron elegidos debido a que, aunque la fracción <1kDa de Alcalase®-Flavourzyme® no fue la que presentó mayor porcentaje de inhibición, la literatura refiere que los hidrolizados proteínicos de pesos moleculares bajos son los que suelen tener mayor efecto hipotensor ²⁰, además de que, debido a que se adicionarían al alimento para ratas, se tomó en cuenta el hecho de que los péptidos de pesos moleculares mayores suelen proveer sabores amargos a los alimentos ²¹.

En la evaluación *in vivo* de la actividad biológica, las ratas alimentadas con las dietas adicionadas produjeron un descenso de las presiones sistólica y diastólica. La mayoría de las evaluaciones de actividad biológica *in vivo*, se efectúan con animales espontáneamente hipertensos, por lo que el efecto hipotensor es más evidente, como en los trabajos de Jauhainen (2002)²² y Curta (2001)²³. Sin embargo, los resultados este estudio pone de manifiesto el potencial de las fracciones peptídicas de hidrolizados de frijol endurecido, como nutracéuticos en el desarrollo de alimentos funcionales.

En el grupo de ratas que recibieron el alimento adicionado con 10 mg/kg de peso de los hidrolizados de Alcalase®-Flavourzyme®, fue notable la disminución en

las presiones arteriales diastólica y sistólica en comparación con el tratamiento blanco negativo. Se observaron valores de 102.5 ± 5.01 y 69.13 ± 5.91 mm/Hg para la PAS y PAD, respectivamente. Sin embargo, en comparación con las ratas tratadas con 5 mg/kg de peso de los hidrolizados de Alcalase®-Flavourzyme® no se notó mucha diferencia.

Destacan las medias de las presiones sistólica de 96.62 ± 5.34 y diastólica de 68 ± 4.78 mm/Hg en las ratas tratadas con 5 mg/Kg de peso de hidrolizados de Pepsina-Pancreatina porque puede observarse que éstas presiones son bajas comparadas con el resto de los tratamientos.

Para el grupo de animales tratados con Captopril® se alcanzaron valores de PAS de 102.88 ± 6.38 mmHg y 98.62 ± 4.44 mmHg en los tratamientos de 5 mg/Kg y 10 mg/Kg de medicamento respectivamente, estas cifras resultan menores que las obtenidas en el tratamiento blanco negativo. Lo anterior demuestra la acción hipotensora del medicamento y permite comparar su efecto con los tratamientos preparados con hidrolizados del sistema Pepsina-Pancreatina en concentraciones de 10 y 5 mg/Kg, los cuales disminuyen respectivamente 1.62 y 2 mmHg más la PAS que el tratamiento adicionado con 10 mg/Kg de medicamento.

Conclusiones

Los resultados obtenidos de las evaluaciones *in vitro* e *in vivo*, establecen bases para considerar a las fracciones peptídicas de los hidrolizados de frijol endurecido como ingredientes nutracéuticos, con potencial para ser empleados en el desarrollo de alimentos de tipo funcionales.

Tomando en cuenta que el frijol endurecido puede ser considerado un producto de desecho, su uso para la obtención de concentrados proteínicos aprovechables en el desarrollo de alimentos funcionales por su actividad biológica inhibitoria de la ECA, es una alternativa particularmente viable en México para el tratamiento de la hipertensión arterial y sus comorbilidades.

Bibliografía

- 1 Lip, G, Pickering T, Hansson L, Lee W, Nadar S. Actualidad en Hipertensión (2003). Science Press. Primera Edición. México, 81-82.
- 2 Mataix Verdú J. Tratado de Nutrición y Alimentación (2009). Editorial Océano. Segunda Edición. Barcelona, España, 1524-1528.
- 3 Tortora, G. Derrickson, B. Principios de Anatomía y Fisiología (2006). Editorial Médica Panamericana S.A. Onceava Edición. México, 757, 802.
- 4 Mendis, S.; Johnston, S.; Fan W. y et al. (2010). La gestión del riesgo cardiovascular y su impacto en el control de la hipertensión arterial en la atención primaria en los entornos con recursos escasos: ensayo aleatorizado por conglomerados. Boletín de la Organización Mundial de la Salud, 401-408.
- 5 Harrison, T. y Braunwald, E. (2001). Principios de Medicina Interna. Editorial Mc Graw Hill / Interamericana. España. 15 (2):1660.
- 6 Segura-Campos, M.R.; Chel-Guerrero, L.A. y Betancur-Ancona, D.A. (2009). Péptidos bioactivos como promotores de la salud. Industria Alimentaria. 31 (3): 10-15).
- 7 Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J. y Millán, F. (2000). Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties. Journal of the American Oil Chemists' Society, 77:447-450.
- 8 Sun, J., He, H., Xie, B.J. (2004). Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. Journal of agricultural and food chemistry, 52:6646-6652.
- 9 Baró, L.; Jiménez, J.; Martínez-Férez, A. y Bouza, J.J. (2001). Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. Ars. Pharmaceutica. 42 (3-4): 135-145).
- 10 Skow, D.; Smith, E.; Shaughnessy, P. (2003). Combination therapy ACE inhibitors and angiotensin-receptor blockers and heart failure. American Family Physician, 68 (9): 1795-1798.
- 11 Meisel, H.; Walsh, D. J.; Murray, B., y FitzGerald, R. J. (2006). ACE inhibitory peptides. In: Nutraceutical proteins and peptides in health and disease. Editado por: Mine, Y., y Shahidi, F. Editorial Taylor & Francis. pp. 269-315.
- 12 Cheung, H-S.; Wang, F-L.; Ondetti, A. M.; Sabo, F. E., y Cushman, W. D. (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. The Journal of Biological Chemistry, 255(2): 401-407.
- 13 Vermeirssen, V.; Van, C. J.; Devos, L., y Verstraete, W. (2003). Release of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity during in vitro gastrointestinal digestion: from batch experiment to semi-continuous model. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 5680-5687.
- 14 Pedroche, J., Yust, M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., Vioque, J. (2002). Utilization of chickpea protein isolates for the production of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory activity. Journal of Science and Food Agriculture. 82:960-965.
- 15 Vioque, J., Megías, C., Yust, M.M., Pedroche, J., Lquari, H., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F. (2004). Purification of an ACE Inhibitory Peptide after Hydrolysis of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Protein Isolates. Journal of Agricultural and Food Chemistry, (52):1928-1932.
- 16 Cho, M.J., Unklesbay, N., Hsieh, F., Clarke, A.D. (2004). Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates. Journal of agricultural and food chemistry. 52(19):5895-5901.
- 17 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. Journal of Biology Chemistry. (193):267-275.
- 18 Hayakari, M., Kondo, Y., Izumi, H. (1978). A Rapid and Simple Spectrophotometric Assay of Angiotensin-Converting Enzyme. Analytical Biochemistry. 84:361-369.
- 19 Sun J, He H, Xie BJ. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *ganoderma lucidum*. J. Agric. Food Chem. 52, 6646-6652 (2004).
- 20 Je, J.Y., Park, P.J., Kwon, J.Y., Kim, A.K. (2004). A Novel Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) Frame Protein Hydrolysate. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (52):7842-7845.
- 21 Tardioli, W. P.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, M. J., y Giordano, C. R. L. (2003). Design of new immobilized-stabilized carboxypeptidase A derivative for production of aromatic free hydrolysates of proteins. Biotechnology Progress, 19: 565-574.
- 22 Jauhiainen, T., R. Korpela, and A. Mäyrä-Mäkinen 2002. VALIO: Information about the Evolus(r) fermented milk. Printed by Lars Eriksen. Finland, pp 1-15.
- 23 Curta, D. (2001). Biozate, Whey protein hydrolysate. Nutraceuticals Now, Summer-2001.