



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A.C.**

**ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA ENZIMA
CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA EN UN
PRODUCTO CÁRNICO ELABORADO CON
HIDROLIZADO DE LACTOSUERO**

Por:

Cynthia Guadalupe Barrón Ayala

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora.

Diciembre del 2012.

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Cynthia Guadalupe Barrón Ayala, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de maestría en ciencias.



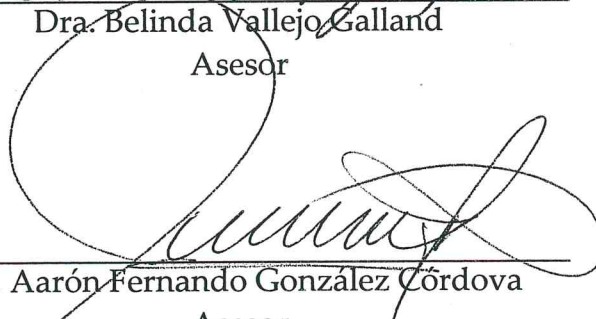
Dr. Juan Pedro Camou Arriola
Director de tesis



M.C. Martín Valenzuela Melendres
Asesor



Dra. Belinda Vallejo Galland
Asesor



Dr. Aarón Fernando González Córdova
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo financiero durante este posgrado y por la preocupación de que más jóvenes se sigan preparando en beneficio de nuestra nación.

Mi reconocimiento al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) por abrir las puertas a tantos jóvenes que tocan sus puertas con inquietud en la investigación.

Al Dr. Juan Pedro Camou por aceptarme como su estudiante, por su confianza y apoyo.

Al M.C. Martín Valenzuela por sus interminables consejos, apoyo técnico y ser una guía muy importante en este proyecto.

A los Dr. Aarón González y Dra. Belinda Vallejo por sus valiosas aportaciones de manera desinteresada y por mantener siempre abiertas sus puertas.

A todo el equipo del laboratorio de carnes por sus asesorías, apoyo incondicional y amistad.

Al laboratorio de productos pesqueros que sin compromiso alguno me permitieron el uso de sus instalaciones y me brindaron su asesoría técnica.

A todos los compañeros de lácteos en especial a Dra. María Jesús Torres y al Dr. José Carlos Figueroa.

A mis compañeros de generación por su gran ayuda, paciencia y sobre todo por su sincera amistad.

A mis padres por siempre preocuparse por nosotros, por ofrecerme su apoyo en todos los proyectos y por su amor incondicional. A mis hermanas que soportan mis altibajos y aun así tienen paciencia para apoyarme.

A mi esposo que con todo su amor me da el entusiasmo para seguir trabajando.

CONTENIDO

	Página
Lista de figuras	viii
Lista de cuadros	ix
Resumen	x
Abstract	xii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1 Ingredientes de los productos cárnicos y su relación con enfermedades	4
2.1.1 Ingredientes de productos cárnicos	5
2.1.1.1 Cloruro de sodio	5
2.1.1.2 Proteínas no cárnicas	6
2.1.1.3 Nitritos	6
2.1.1.4 Edulcorantes	7
2.1.1.5 Ascorbatos, eritorbatos y fosfatos	7
2.1.1.6 Fuente cárnica	7
2.2 Alimentos funcionales cárnicos	8
2.3 Hipertensión arterial	9
2.3.1 Prevalencia de hipertensión en el mundo	10
2.3.2 Prevalencia de hipertensión en México	10
2.3.3 Rutas metabólicas en la regulación de la presión arterial	11
2.4 Tratamientos de la regulación de la presión arterial	13
2.4.1 Fármacos sintéticos	13
2.4.2 Alternativas naturales	16
2.4.3 Compuestos inhibidores de la ECA	16
2.4.3.1 La Leche como fuente de péptidos inhibidores de ECA	17
2.4.3.2 Mecanismos de obtención de péptidos inhibidores de ECA provenientes de suero de leche	18
2.4.3.3 Relación de la estructura de ECA con los compuestos inhibidores	22

CONTENIDO (Continuación)

	Página
2.4.3.4 Estabilidad de péptidos inhibidores de ECA	23
2.4.4 Alimentos con propiedades antihipertensivas	25
3. Hipótesis	29
4. Objetivos	30
4.1 Objetivo general	30
4.2 Objetivos específicos	30
5. Metodología	31
5.1 Materia prima y reactivos	31
5.2 Hidrólisis de lactosuero	31
5.3 Grado de hidrólisis	32
5.4 Perfil electroforético	34
5.5 Actividad inhibidora de la ECA en los hidrolizados	35
5.6 Elaboración del producto cárnico	36
5.7 Análisis estadístico	41
6. Resultados y Discusión	42
6.1 Hidrolizados de lactosuero	42
6.1.1 Grado de hidrólisis	42
6.1.2 Perfil electroforético	44
6.1.3 Actividad inhibidora de ECA	46
6.2 Producto cárnico	52
6.2.1 Actividad inhibidora de ECA en el producto cárnico	52
6.2.2 Parámetros físicos	54
6.2.3 Actividad inhibidora de ECA durante el almacenamiento	62
6.2.4. Parámetros físicos durante el almacenamiento	64
7. Conclusiones	69
8. Referencias	70

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Acción de la ECA I sobre el sistema renina-angiotensina y la síntesis de óxido nítrico	14
Figura 2. Reacción de OPA con grupos amino libres	33
Figura 3. Grado de hidrólisis de soluciones de lactosuero hidrolizadas con las enzimas Alcalase 2.4L y Flavourzyme .	43
Figura 4. Gel de poliacrilamida-SDS de hidrolizados de lactosuero con las enzimas Flavourzyme y Alcalase 2.4L a los tiempos de hidrólisis de: 0, 15, 30, 60, 180 y 300min	45
Figura 5. Porcentaje de inhibición de la ECA por extractos solubles en agua de lactosuero hidrolizado	47

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
Cuadro 1.	Actividades inhibidoras de la ECA obtenidas de diferentes fuentes y procesos	19
Cuadro 2.	Ingredientes de los diferentes tratamientos	38
Cuadro 3.	Ciclos de cocción del producto	39
Cuadro 4.	IC ₅₀ y concentración de las fracciones menores a 3kDa de los hidrolizados de lactosuero	49
Cuadro 5.	IC ₅₀ y concentración de las fracciones menores a 3kDa del producto ante los diferentes tratamientos	53
Cuadro 6.	Parámetros de color CIE-Lab área externa e interna del producto	55
Cuadro 7.	Valores de pH y porcentaje de rendimiento de los tratamientos	59
Cuadro 8.	Análisis de perfil de textura y esfuerzo al corte de los diferentes tratamientos	60
Cuadro 9.	IC ₅₀ y concentración de las fracciones menores a 3kDa del tratamiento 3 a lo largo del tiempo	63
Cuadro 10.	Parámetros de color CIE-Lab del tratamiento 3 a lo largo del tiempo	65
Cuadro 11.	Potencial de hidrógeno del producto del tratamiento 3 a lo largo del tiempo	67
Cuadro 12.	Análisis de perfil de textura y esfuerzo al corte del tratamiento 3 a lo largo del tiempo	68

RESUMEN

Se ha demostrado que la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) reduce los niveles de la presión arterial. Algunos fármacos sintéticos inhiben esta enzima, sin embargo tienen la desventaja de presentar efectos secundarios. Investigaciones han demostrado que algunos hidrolizados de proteínas poseen actividad inhibidora de ECA los cuales pueden ser una alternativa en el tratamiento de la hipertensión, enfermedad que afecta a más del 26.4% de la población mundial adulta. La carne y sus productos han sido relacionados con este padecimiento, no obstante la sal es el ingrediente que podría tener mayor repercusión en la elevación de la presión sanguínea. El objetivo del presente estudio fue analizar el potencial antihipertensivo in vitro de un producto cárnico a partir de la integración de un hidrolizado de lactosuero con actividad inhibidora de ECA. La hidrólisis se probó sobre una solución de lactosuero al 5% de proteína con la acción de las enzimas Alcalase 2.4L y Flavourzyme durante 15, 30, 60, 180 y 300 min. Se evaluó el grado de hidrólisis por el método de orto-ftaldehído y se realizó un perfil electroforético. Los hidrolizados fueron fraccionados hasta un punto de corte de 3 kDa y se evaluó la actividad inhibidora de ECA. El hidrolizado con mayor actividad se incorporó en un producto cárnico a los niveles de 10, 20 y 30%. Se evaluó el potencial antihipertensivo del producto cárnico mediante la determinación del IC_{50} valor definido como la concentración del hidrolizado necesaria para inhibir la actividad de la ECA en un 50%, así como algunos parámetros físicos

de calidad. Se evaluó su comportamiento en almacenamiento a 4°C por 29 días. El grado de hidrólisis obtenido para Alcalase 2.4L fue de 16 a 24% y para Flavourzyme de 4 a 16%. El valor más bajo de IC₅₀ para las fracciones < 3 kDa fue de 59.80 µg/mL para Alcalase 2.4L hidrolizado por 300 min. Este último hidrolizado fue adicionado al producto y se observó un incremento en el potencial antihipertensivo. De un IC₅₀ de 1548.25 µg/mL y 845.98 µg/mL para el control agua y control suero respectivamente, a un IC₅₀ de 258.78 µg/mL para el tratamiento. Durante el almacenamiento el promedio de la actividad inhibidora de ECA no se vio afectado. Estos resultados demuestran que la incorporación de lactosuero hidrolizado a un producto cárnico le confiere actividad inhibidora de ECA y a su vez este potencial antihipertensivo es estable en almacenamiento.

Palabras clave: Enzima convertidora de angiotensina, lactosuero, producto cárnico, hipertensión.

ABSTRACT

It has been shown that inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) reduces blood pressure levels. Some synthetic drugs inhibit this enzyme; however, they have the disadvantage of side effects. Research has shown that some protein hydrolysates possess ACE inhibitory activity which may be used as an alternative in hypertension treatment, a disease that affects more than 26.4% of the adult population. Meat and meat products have been associated with this condition; however, salt is the ingredient that could have the greatest impact on blood pressure increase. The objective of this study was to analyze the in vitro antihypertensive potential of a meat product with whey hydrolyzate that possesses ACE inhibitory activity. Two enzymes, Alcalase 2.4L and Flavourzyme, were used in a 5% whey solution for 15, 30, 60, 180 and 300 min. Hydrolysis degree analysis by o-ftaldehyde method and an electrophoresis profile were performed. Hydrolyzates were fractionated using a 3 kDa cutoff membrane and evaluated for ACE inhibitory activity. The hydrolyzate with higher inhibitory activity was added in the meat product at 10, 20 and 30% levels. Antihypertensive potential measured by the IC_{50} in the product was assessed as well as some physical parameters of quality. The meat product was stored at 4°C during 29 days and analyzed every 7 days. Hydrolysis degree observed in this study of Alcalase 2.4L hydrolyzates ranged between 16 and 24% and those of Flavourzyme hydrolyzates from 4 to 16%. The lowest IC_{50} value of the <3kDa fraction was 59.80 mg/mL for Alcalase 2.4L hydrolyzate for 300 min. The incorporation of whey hydrolyzate to meat product resulted in an

increase in the antihypertensive potential from 1548.25 $\mu\text{g/mL}$ of water control product and 845.98 $\mu\text{g/mL}$ of whey control product to 258.78 $\mu\text{g/mL}$ of treatment. ACE inhibitory activity of whey hydrolyzates in the product was not affected during the storage. These results demonstrate that whey hydrolyzate incorporation to a meat product confers ACE inhibitory activity to it, and furthermore this antihypertensive potential remains stable during refrigeration storage.

Keywords: Angiotensin converting enzyme, whey, meat product, hypertension.

1. INTRODUCCIÓN

Una gran parte de la población mundial se ha visto afectada por un padecimiento conocido como hipertensión, esta enfermedad se manifiesta en la elevación de los valores de presión sistólica/presión diastólica a un promedio mayor de 140/90 mmHg (Kearney *et al.*, 2005). Este padecimiento ha llegado a ser endémico y afecta a mas del 26.4% de la población adulta en el mundo, sin discriminar los países en vías de desarrollo. Padecer presión arterial elevada por un periodo largo de tiempo incrementa los riesgos de presentar enfermedades cardiovasculares, tales como ataque cerebrovascular, ataque al corazón, aneurisma arterial y fallas del hígado (Steffen *et al.*, 2005); enfermedades que reducen la calidad de vida.

El conocimiento de las rutas metabólicas que regulan la elevación de la presión arterial es un aspecto clave en la búsqueda de soluciones. Muchos de los estudios se han enfocado al sistema renina-angiotensina buscando inhibir la enzima convertidora de angiotensina (ECA) para así disminuir los niveles de la presión arterial.

El hombre en la búsqueda de mejorar su estado de salud ha desarrollado diversas tecnologías que combaten las enfermedades. Tal es el caso de los fármacos sintéticos que pueden inhibir la ECA, pero con la desventaja de presentar efectos secundarios (Dean, 2001; Cicardi *et al.*, 2004). Por ello, se ha

propuesto el uso de algunos compuestos naturales como una alternativa para su regulación, pero estos no han tenido suficiente sustento científico y se sugiere que deben ser usados en conjunto con los fármacos sintéticos y en supervisión de un médico (Wilburn *et al.*, 2004). Por esta razón se continúa en la búsqueda de alternativas para la reducción de la presión arterial.

Recientemente, se han desarrollado péptidos inhibidores de ECA a partir de proteínas alimenticias con el propósito de reducir los efectos secundarios de los tratamientos sintéticos (Fitzgerald y Murray, 2006). Las proteínas de la leche han sido la fuente más estudiada, de la cual se han obtenido péptidos con actividad inhibidora de ECA siendo los provenientes de la caseína los de mayor trascendencia (Gobbetti *et al.*, 2000; Seppo *et al.*, 2003; Quirós *et al.*, 2007; Pihlanto *et al.*, 2010). Por otro lado el lactosuero también es capaz de liberar por medio de hidrólisis de sus proteínas péptidos derivados actividad inhibidora. Además, el suero de leche es una buena fuente para la obtención de péptidos bioactivos por lo que es una alternativa de uso para el suero de leche generado de las actividades de la industria quesera, proporcionándole un valor agregado a este subproducto (Saito *et al.*, 1997; Abubakar *et al.*, 1998; Pihlanto-Leppala *et al.*, 2000). Fuentes naturales como las proteínas de la leche son una opción para obtener los péptidos inhibidores.

A su vez diversos investigadores proponen el uso de los péptidos inhibidores como ingredientes de alimentos funcionales. Sin embargo, el mercado ofrece tan solo algunos productos alimenticios con actividad antihipertensiva, siendo estos en su mayoría productos lácteos como leches fermentadas, quesos, yogurts o polvos de hidrolizados (Nakamura *et al.*, 1995 a; Seppo *et al.*, 2003; Mizuno *et al.*, 2005). Debido a que los productos cárnicos han sido relacionados con la elevación de la presión arterial por sus contenidos de

sodio y ácidos grasos saturados (Ascherio *et al.*, 1996; Sacks *et al.*, 2001; Vollmer *et al.*, 2001), la industria cárnica se ha preocupado por ofrecer productos que satisfagan las necesidades de salud de los consumidores. La adición de péptidos inhibidores de la ECA a estos productos, podría resultar en un alimento potencialmente antihipertensivo diferente a los ya existentes. El objetivo del presente trabajo fue elaborar un producto cárnico con actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina, mediante el uso de hidrolizado de lactosuero como ingrediente.

2. ANTECEDENTES

2.1 Ingredientes de los Productos Cárnicos y su Relación con Diversas Enfermedades.

La carne y sus derivados son un valioso alimento debido a que proporciona micronutrientes tales como el hierro, selenio, vitaminas A, B12 y ácido fólico. Micronutrientes que no están presentes en las plantas o es baja su biodisponibilidad, además es alta en proteína y baja en carbohidratos (Jiménez-Colmenero *et al.*, 2001; Biesalski, 2005), sin embargo en los últimos años los consumidores la han relacionado con enfermedades tales como cáncer, enfermedades al corazón y obesidad, esto debido principalmente a su contenido de grasas saturadas (Demeyer *et al.*, 2008; Troy y Kerry, 2010), no obstante el perfil de grasas puede ser modificado en vías de reducción de los ácidos grasos saturados por medio de modificación de la dieta de los animales (Troy y Kerry, 2010).

Los productos cárnicos también han sido relacionados con la hipertensión principalmente por su contenido de sodio por la sal añadida, cabe señalar que los productos cárnicos no son los únicos que aportan altas cantidades de sodio a la dieta, si no que otros productos procesados también aportan estas cantidades (Desmond, 2006). Por ejemplo en Estados Unidos de América el 21% del sodio dietario es aportado por la carne y sus productos cárnicos, mientras que el 26.8%

es aportado por el cereal y sus productos (Desmond, 2006). Aunque los productos cárnicos se han relacionado con el incremento de la presión arterial la realidad es que las características de un producto están dadas por sus ingredientes.

2.1.1 Ingredientes de Productos Cárnicos

Dentro de estos ingredientes se encuentran el cloruro de sodio, sustitutos de proteína, fosfatos, edulcorantes, nitritos, conservadores y la carne en si.

2.1.1.1 Cloruro de sodio. La carne fresca posee de 50 a 70 mg de sodio por 100 g, por lo que la sal añadida es la mayor fuente de sodio en un producto cárnico. La sal se agrega en la formulación del producto ya que contribuye en el proceso de disolución de proteína y en la retención de agua en el producto, su reducción generaría efectos adversos como pérdida de agua y una textura desfavorable (Fernández-Ginés *et al.*, 2005). La relación con el incremento de la presión arterial está dada por la retención de agua causada por el sodio lo que aumenta la presión osmótica sanguínea. Sin embargo, una dieta balanceada en combinación con la reducción en la ingesta de sodio podría reducir la presión arterial; se recomienda una ingesta diaria no mayor a 100mmol de sodio, equivalente a 5.8g de NaCl (Sacks *et al.*, 2001; Vollmer *et al.*, 2001; He y Mac Gregor, 2002).

El NaCl puede ser sustituido por KCl en productos cárnicos, sin exceder el 50% de sustitución para no afectar la aceptación del producto (Pearson y Gillett, 1996), un ejemplo es el trabajo realizado por el equipo de Horita *et al.* (2011) en una mortadela donde el 50% de NaCl fue sustituido por mezclas de KCl con MgCl₂ o CaCl₂ sin afectar las características del producto, otro ejemplo son los resultados obtenidos por Guàrdia *et al.* (2008) en donde se concluyó que

podía sustituirse el 50% de NaCl por 50% de KCl o mezcla de KCl-lactato de K (40:10) sin afectar la aceptación de los consumidores.

2.1.1.2. Proteínas no cárnicas. Usada en productos de carne procesados, debido a que favorece la capacidad de retención de agua y estabilidad en fórmulas reducidas en grasa (Chin *et al.*, 2000). Dentro de estas proteínas se encuentran las de soya, trigo y suero de leche, utilizadas desde un 2.5% hasta un 6%(Zhang *et al.*, 2010). En México el uso de suero de leche en polvo esta permitido hasta un 3.5% (Salud, 1994).

La sustitución de proteínas cárnicas por proteínas de otras fuentes reducen los niveles de lipoproteínas de baja densidad comparadas con la proteína animal, como ocurre con la adición de proteína de soya (Sadler, 2004; Fernández-Ginés *et al.*, 2005), por su parte el suero de leche se utiliza en productos cárnicos reducidos en grasa con el fin de no afectar las características físicas y sensoriales que la reducción de grasa puede ocasionar (Zhang *et al.*, 2010), por lo que su adición lejos de perjudicar a la salud, podría mejorarla.

2.1.1.3 Nitritos. Su acción antioxidante, antimicrobiana (principalmente en prevención del crecimiento de *Clostridium botulinum*), desarrollador de sabor y estabilizador de color lo hacen un ingrediente tecnológicamente funcional muy importante. Los nitritos se han relacionado con cáncer de colon debido a la formación de endógena de compuestos nitro, sin embargo la cantidad residual de nitritos en el alimento es muy baja, además para que las nitrosaminas se formen deben cumplirse ciertos requisitos como lo es altas temperaturas (mayores a 130 °C) (Fernández-Ginés *et al.*, 2005; Honikel, 2008).

Los efectos positivos de este ingrediente primordialmente su acción microbiológica, sobre pasan la baja posibilidad de formar las nitrosaminas.

2.1.1.4 Edulcorantes. Son ingredientes que se utilizan principalmente por su habilidad de endulzar, lo que contribuye directamente en el sabor también para contrarrestar la astringencia de la sal. Los ingredientes más utilizados son el azúcar, dextrosa, sólidos de jarabe de maíz y lactosa. El azúcar puede provocar reacciones de maillard ya que es reductora y reacciona con aminoácidos. Se pueden utilizar sustitutos de azúcar no reductores para evitar estas reacciones como la sucralosa (Pearson y Gillett, 1996).

2.1.1.5 Ascorbatos, eritorbatos y fosfatos. Los dos primeros tienen la función de asegurar el desarrollo del color deseado en productos curados, el tercero ayuda a mejorar la retención de agua. Estos tres ingredientes se comercializan como sales de sodio, sin embargo, la concentración de fosfatos no debe de ser mayor a 0.5%, de ascorbatos y eritorbatos no mayor a 500ppm (Pearson y Gillett, 1996), la adición de estos ingredientes no representa una fuente importante de sodio y por tanto no es un peligro en el incremento de la presión arterial.

2.1.1.6 Fuente cárnica. Dentro de las fuentes cárnicas para elaborar los producto se encuentran la carne de res, puerco, oveja, aves de corral y pescado. La carne de res tiene una relación de ácidos grasos poliinsaturados/ácidos grasos saturados de 0.11 mientras que el musculo de puerco y oveja presentan una relación de 0.58 y 0.15, respectivamente(Wood *et al.*, 2008), lo que quiere decir que la carne de res presenta una proporción más alta de ácidos grasos saturados. La relación más alta de ácidos grasos saturados que insaturados en la res se debe a que los ácidos grasos están sujetos a la biohidrogenación en el rumen. Los ácidos grasos saturados son los responsables de incrementar los niveles de colesterol de baja densidad (LDL) en el plasma, lo que esta relacionado con incremento en el riesgo de presentar enfermedades

cardiovasculares. Sin embargo hoy en día se busca cambiar el perfil de éstos ácidos grasos en los animales por medio de la alimentación. Por otra parte la carencia de rumen en animales como puercos, aves de corral y pescado, resulta en una menor hidrogenación de los ácidos grasos y por tanto menor cantidad de ácidos grasos saturados (Decker y Park, 2010). El elaborar los productos cárnicos a partir de carne baja en grasa o bien de animales no rumiantes reduciría la posibilidad de incrementar la presión arterial.

La sal y los ácidos grasos saturados que aportan las grasas provenientes de la carne son los mayores factores que intervienen en el incremento de la presión arterial. Sin embargo la sal puede ser reducida en la mayor medida posible, siempre y cuando no afecte las propiedades organolépticas y funcionales. Mientras que los ácidos grasos saturados se pueden evitar usando como ingredientes carnes bajas en grasa y/o carne proveniente de aves de corral o el puerco.

Por otro lado los productos cárnicos podrían convertirse en un alimento funcional al adicionarse compuestos con propiedades antihipertensivas y al reducir en ellos aquellos ingredientes que se han asociado con un posible incremento en la presión arterial.

2.2 Alimentos Funcionales Cárnicos

Ante la evidencia de que la alimentación esta directamente relacionada con la salud del humano, los consumidores buscan que los alimentos no solo satisfagan el hambre y aporten los nutrientes necesarios al hombre, sino además,

prevengan enfermedades y mejoren su estado físico y mental (Roberfroid, 2003 y Menrand, 2003).

Según un grupo de expertos Europeos (Roberfroid, 2000) un alimento funcional se considera como tal si demuestra de manera satisfactoria que tiene uno o mas efectos benéficos más allá de los nutricionales de modo que sea relevante al estado de salud y reducción de riesgo de alguna enfermedad.

La investigación en los productos cárnicos se ha orientado a la creación de productos funcionales, adicionando compuestos con potencial para prevenir enfermedades o mejorar la salud. Ejemplos de estos productos son la adición de fibra y reducción de grasa (Cardoso *et al.*, 2008), compuestos antioxidantes (Narambuena *et al.*, 2004), hierbas y especies (Zhang *et al.*, 2010), proteínas vegetales (Chin *et al.*, 2000), entre otros.

Sin embargo en lo que respecta alimentos cárnicos con funcionalidad antihipertensiva solo se tiene evidencia de algunos alimentos cárnicos curados o fermentados (ejemplos se verán más adelante), pero no se han desarrollado más productos cárnicos con otras características sensoriales diferentes a los de estos alimentos.

2.3 Hipertensión Arterial

La hipertensión arterial está definida como la elevación de la presión arterial y se manifiesta en el incremento de los valores de la presión sistólica/presión diastólica a un promedio por encima de 140/90 mmHg (Kearney *et al.*, 2005). Dentro de las causas de la hipertensión se encuentran altos consumo de sal, sobrepeso, no hacer suficiente ejercicio, el alcohol y el tabaco (OMS, 2011).

2.3.1 Prevalencia de Hipertensión en el Mundo

La hipertensión a nivel mundial es uno de los factores de riesgo más importantes en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. La organización mundial de la salud (OMS), en el año 2004, la reportó como el factor principal de causa de muerte en el mundo, representando un 12.8% del porcentaje total, lo que significó 7.5 millones de defunciones (OMS, 2009). En un análisis de datos realizado por Kearney *et al.* (2005), estimaron que en el año 2000 en el mundo existían 972 millones de adultos (personas mayores de 20 años) con hipertensión, es decir el 26.4% de la población mundial y que esta proporción podría incrementarse a 29.2% es decir 1560 millones de individuos para el 2025. En 1990 la hipertensión ocupaba a nivel mundial la posición 7 en la lista de los primeros 10 riesgos para disminuir los años de vida o vivir inhabilitados de alguna forma (Murray y Lopez, 1997). En países como Japón una cuarta parte de su población sufre de alta presión (Enari *et al.*, 2008). Este padecimiento ha llegado a ser considerado como endémico.

La localización de la población hipertensa en el mundo se encuentra distribuida de la siguiente manera: en los países en vías de desarrollo, 649 millones y en países desarrollados, 333 millones (Kearney *et al.*, 2005).

2.3.2 Prevalencia de Hipertensión en México

El gobierno de México realiza estudios poblacionales para desarrollar estrategias que beneficien a sus pobladores, uno de los estudios realizados es la determinación de las principales causas de mortalidad. El listado esta encabezado por la Diabetes *mellitus* 14%, seguida por enfermedades isquémicas del corazón 11.1%, enfermedades cerebrovasculares 5.6% e hipertensión la cual

ocupa la posición número 7 con un 2.9% (15, 694) de las defunciones en el 2008. Además, la presión arterial elevada es un factor para presentar las enfermedades isquémicas del corazón y enfermedades cerebrovasculares.

En Sonora en el año 2008 las enfermedades del corazón ocuparon el primer lugar como causa de muerte con 2790 defunciones lo que representó 21.1% de las defunciones, porcentaje en el cual estaba incluida la hipertensión arterial como factor de riesgo para presentar estas enfermedades (SINAISb, 2010).

Esta pandemia no ha discriminado estratos económicos ni regiones del mundo. Afecta a gran parte de la población mundial adulta y es causal de enfermedades que representan las primeras causas de muerte a nivel mundial.

2.3.3 Rutas Metabólicas en la Regulación de la Presión Arterial

La regulación de la presión arterial está controlada por varias rutas bioquímicas y sus interacciones. La regulación ha sido asociada principalmente al sistema renina-angiotensina, aunque también se involucran el sistema quinina-óxido nítrico, el sistema neutral endopeptidasa y el sistema de la enzima convertidora de endotelina (FitzGerald *et al.*, 2004).

El sistema renina-angiotensina es un sistema desencadenado de reacciones el cual comienza con la activación de la renina a partir de su precursor prorenina, la renina activa al angiotensinógeno liberando la angiotensina (Ondetti y Cushman, 1982; Leckie, 2005). Por tanto, la renina es responsable de liberar el angiotensinógeno el cual libera a su vez a la angiotensina I un decapeptido sin actividad DRVYIHPFHL, que por acción de

una enzima conocida como enzima convertidora de angiotensina (ECA) le es removido un dipéptido HL resultando en la angiotensina II de secuencia DRVYIHPF un potente vasoconstrictor lo que resulta en incremento de la presión sanguínea ((Nakamura *et al.*, 1995 b; Mullally *et al.*, 1997). La importancia que tiene la ECA recae en que es la responsable de la liberación de la angiotensina II.

ECA tiene otras funciones dentro de la regulación de la presión sanguínea. Es capaz de desfragmentar el vasodilatador bradiquinina mediante la remoción del dipéptido C-terminal resultando en fragmentos de péptidos inactivos (FitzGerald *et al.*, 2004), lo que ocasionará la eliminación de un regulador de la presión arterial y por ende incremento de ésta.

En el sistema quinina óxido nítrico la regulación es por medio del óxido nítrico (ON), ya que éste es un vasodilatador. El ON se obtiene a partir de L-arginina por el endotelio vascular (Rees *et al.*, 1989), liberación que proviene del péptido bradiquinina que al unirse con su receptor β genera una serie de reacciones que incrementarán el calcio intracelular. El calcio estimulará la síntesis de ON a partir de L-arginina, este camino metabólico puede ser inhibido por la ECA al hidrolizar la bradiquinina (FitzGerald *et al.*, 2004), por lo que ECA interviene de forma negativa en este sistema al desfragmentar su compuesto inicial.

En el sistema de la enzima convertidora de endotelina la angiotensina II es convertida por varios pasos hasta endotelina I (potente vasoconstrictor) por medio de la enzima convertidora de endotelina (FitzGerald *et al.*, 2004). La liberación de endotelina I puede ser inhibida por el óxido nítrico del endotelio vascular (Thorin *et al.*, 1997). Sin embargo la producción del óxido nítrico puede

ser inhibida por ECA por lo que no realizaría la función de inhibir la endotelina I, de esta manera ECA I estaría impidiendo la acción de tres sistemas de regulación de la presión arterial: sistema ON, sistema endotelina y el propio renina angiotensina.

Bajo el contexto antes descrito la ECA tiene su intervención en la regulación de la presión arterial de diversas formas, según se observa en la figura 1. ECA cataliza la formación de un vasoconstrictor al convertir angiotensina I sin actividad fisiológica en angiotensina II un vasoconstrictor incrementando la presión arterial. Además, ECA es capaz de hidrolizar la bradiquinina lo que ocasiona la inhibición de la síntesis de óxido nítrico, un vasodilatador, por tanto impide la inhibición de la endotelina I por el ON. La inhibición de ECA se considera una valiosa herramienta para la regulación de la presión arterial.

2.4 Tratamientos en la Regulación de la Presión Arterial

A partir del conocimiento de las rutas metabólicas en el control de la presión arterial se han desarrollado diversos métodos para ayudar a controlar la presión sanguínea que van desde fármacos sintéticos, control de la dieta y ejercicio, así como tratamientos naturales.

2.4.1 Fármacos Sintéticos

La inhibición del sistema renina-angiotensina es la forma en que actúan la mayoría de los fármacos sintéticos, utilizando estrategias como inhibir la

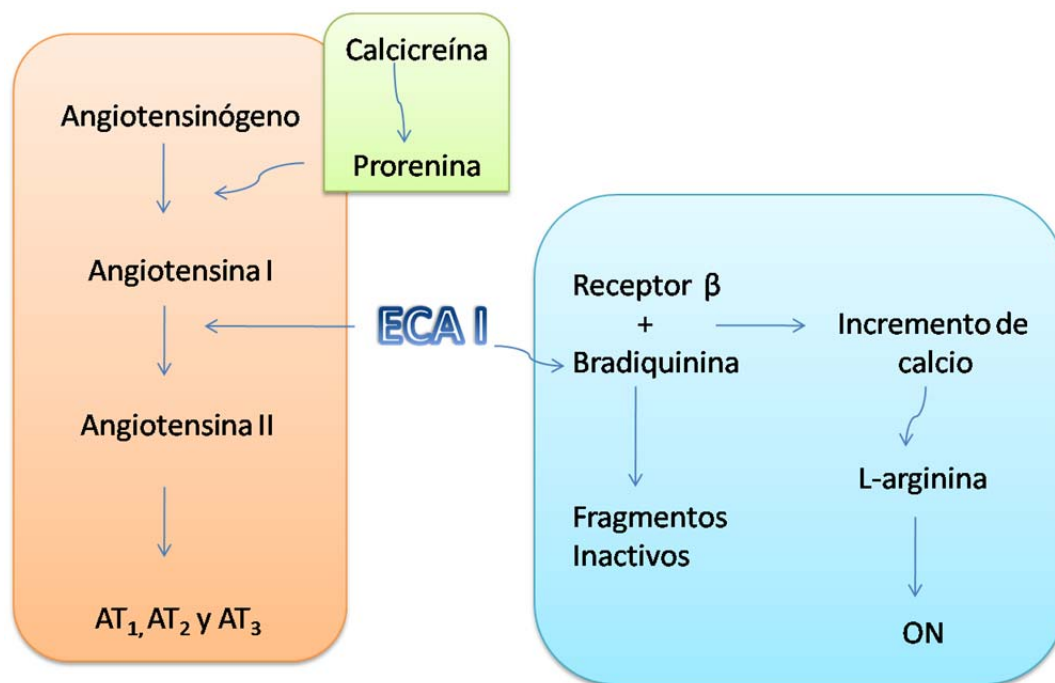


Figura 1. Acción de la ECA I sobre el sistema renina-angiotensina y la síntesis de óxido nítrico.

secreción de renina del aparato yuxtaglomerular, inhibir ECA o bloquear la acción de la angiotensina II, lo que da pie a una gama de estas medicinas:

Existen inhibidores de la secreción de renina, un ejemplo de estos inhibidores es el remikiren, el cual baja la actividad de la renina plasmática evitando la formación de angiotensina II (Novellla, 2008), reduce la natriúresis y produce una leve caída de la presión arterial al administrarlo por 7 días en pacientes con un rango de hipertensión de media a moderada (Paassen *et al.*, 2000). Otro ejemplo es enalkiren y al igual que remikiren inhiben la formación de angiotensina II reduciendo la presión arterial (Fisher *et al.*, 1994).

También hay fármacos capaces de inhibir la ECA de esta manera inhabilitan la formación de la angiotensina II, además se evita la hidrólisis de bradiquinina y se impide la inhibición de la síntesis de óxido nítrico, lo que logrará una mejor regulación de la presión arterial. Dentro de estos fármacos se encuentran benazepril, captopril, enalapril, lisinopril, quinapril, perindopril y ramipril de uso oral diario (Zarco, 2001).

Estos fármacos sintéticos tienen la desventaja de que causan hipotensión, incrementan los niveles de potasio, reducen las funciones renales y producen angiodema (Cicardi *et al.*, 2004). Se han presentado 6 casos de fallecimiento a causa de obstrucción de vías respiratorias por causa de angiodema relacionada con inhibidores de ECA (Dean, 2001). Estos fármacos de uso oral ocasionan efectos secundarios por tanto se siguen buscando otras opciones más convenientes. Además se hace necesario encontrar alternativas más seguras y naturales.

2.4.2 Alternativas Naturales

La búsqueda de otros tratamientos para tratar la hipertensión ha llevado a estudios de los compuestos naturales. Dentro de estas alternativas se encuentran la co-enzima CoQ10, ácidos grasos omega-3, ajo, vitamina C y L-arginina.

Se ha visto que gran parte de los pacientes con hipertensión tienen deficiencia de CoQ10 y que su administración reduce la presión arterial (Singh *et al.*, 1999). Los ácidos grasos omega-3 contenidos en el aceite de pescado reducen la presión arterial modulando el ion calcio intracelular, el cual da las señales para la dilatación del musculo liso vascular (Wilburn *et al.*, 2004). Otro ejemplo es el ajo fresco el cual contiene en sus paredes celulares el ácido precursor de la alicina, el cual relaja el músculo liso y es vasodilatador (Wilburn *et al.*, 2004). La vitamina C, actúa como antioxidante previniendo la degradación de oxido nítrico (Khosh y Khosh, 2001). El aminoácido L-arginina al ser el sustrato para la síntesis del oxido nítrico, funciona como su precursor produciendo mas de este vasodilatador (Huynh y Tayek, 2002). Los suplementos naturales no pueden ser utilizados como forma única de modulación de la presión si no que deben de ser utilizados junto con una modificación al estilo de vida, medicamentos convencionales y bajo supervisión médica. Éstos no pueden ser utilizados como una alternativa “segura” solo por ser naturales (Wilburn *et al.*, 2004).

2.4.3 Compuestos Inhibidores de la ECA

Se han reconocido componentes de los alimentos como ingredientes de interés para mejorar la salud: componentes derivados de las proteínas, lípidos,

oligosacáridos, minerales, vitaminas y antioxidantes. De esta manera se han identificado péptidos con actividad antihipertensiva. Estos péptidos corresponden a fragmentos que se encuentran dentro de las proteínas precursoras, pero que pueden liberarse mediante hidrólisis y de esta manera ejercer la función antihipertensiva (Juárez, 2006).

Pueden ser utilizados como ingredientes en la elaboración de alimentos funcionales o formar parte de preparaciones farmacéuticas, aplicadas en la prevención y tratamiento (Korhonen y Pihlanto, 2006). Funcionan inhibiendo la ECA, la cual está relacionada al sistema renina-angiotensina regulador de la presión sanguínea (Nakamura *et al.*, 1995 b; Mullally *et al.*, 1997) Se han obtenido péptidos antihipertensivos a partir de la hidrólisis de las siguientes proteínas: proteínas del salmón Rosado (*Oncorhynchus gorbuscha*) mediante hidrólisis con la enzima papaína (Enari *et al.*, 2008); hidrólisis de proteínas de la cola del krill (*Euphausia superba*) con la enzima termoasa PC10F (Hatanaka *et al.*, 2009); soya con la enzima Alcalase 2.4L (Wu y Ding, 2002); huevo a partir de ovoalbúmina por hidrólisis con quimiotripsina o clara de huevo hidrolizada con pepsina (Aleixandre *et al.*, 2008) y de diferentes proteínas lácteas.

2.4.3.1 La leche como fuente de péptidos inhibidores de ECA. Las proteínas lácteas han sido las más estudiadas para la obtención de péptidos inhibidores de ECA: caseína y las proteínas del suero de leche (β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, seroalbúmina e inmunoglobulina). Las proteínas mayoritarias de la caseína son α_{s1} -caseína (12-15 g/L) y β -caseína (9-11 g/L) (Yamamoto y Takano, 1999), de las cuales se han encontrado algunos péptidos inhibidores de ECA por medio de hidrólisis enzimática (Yamamoto y Takano, 1999).

2.4.3.2 Mecanismos de obtención de péptidos inhibidores de ECA provenientes de suero de leche. La concentración de las principales proteínas del suero de leche es aproximadamente 0.9g/L de α -lactoalbúmina y 3.0g/L de β -lactoglobulina. Según Yamamoto y Takano (1999) la β -lactoglobulina tiene una estructura rígida que la hace resistente a su digestión.

La actividad inhibidora de ECA puede ser comprobada de manera in-vitro e in-vivo. In vitro por medio de la inhibición de la ECA reflejada en los valores de IC_{50} el cual esta definido como la concentración necesaria para reducir la actividad de ECA al 50%. In vivo se representa por la disminución de la presión arterial en organismos vivos como pueden ser ratas en modelos de investigación o seres humanos.

Las diferencias encontradas en el potencial de inhibición dependen de varios factores, como tipo de hidrólisis, acción de la enzima y condición de la hidrólisis (concentración de fuente proteica, pH y tiempos de hidrólisis). El potencial inhibitorio de ECA es expresado como IC_{50} en unidades de μ M cuando se tiene identificado el péptido o bien solamente como μ g/mL cuando no se tiene identificado los péptidos bioactivos y por tanto no se puede inferir en molaridades.

La hidrólisis de proteínas puede ser enzimática, química o mediante procesos fermentativos. En el cuadro 1 se observan algunos ejemplos de hidrolizados o péptidos con actividad inhibidora de ECA (Hernández, 2002). La enzimas pueden ser del tipo de exoproteasas y endoproteasas. Las exoproteasas hidrolizan los aminoácido o dipéptidos de los extremos amino y carboxilo terminales, mientras que las endoproteasas hidrolizan los enlaces peptídicos

Cuadro 1. Actividades inhibitoras de la ECA obtenidas por diferentes fuentes y procesos.

Tipo de hidrólisis	Enzimas	Fuente de proteína	IC ₅₀ μM*	IC ₅₀ μg/mL**	Referencia
Enzimático de origen animal	Pepsina, tripsina y quimiotripsina	Suero de leche	77a 409 (α-la) 521 a 1029 (β-lg)		(Pihlanto-Leppala <i>et al.</i> , 2000)
Enzimático de origen vegetal	Tripsina	Suero de leche	42.6 (β- lg)	30.75	(Mullally <i>et al.</i> , 1997)
	Proteasa D3	Soya	NA	180	(Kodera y Nio, 2006)
	Glycime max	Caseinato	NA	100	
		Gluten de trigo	NA	340	
Enzimático de origen microbiano	Termolisina	Suero de leche	NA	200	
		Aislado de β-lactoglobulina	34.07 79.08	19.54 30.95	(Hernández-Ledesma <i>et al.</i> , 2007) (Hernández-Ledesma <i>et al.</i> , 2007)
	Proteinasa K	Suero de leche	141	25.97	(Abubakar <i>et al.</i> , 1998)
Proceso fermentativo	<i>Lb.helveticus</i> y	Leche	9	0.72	(Nakamura <i>et al.</i> , 1995 b)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Leche	5	0.47	(Nakamura <i>et al.</i> , 1995 b)
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Leche	NA	34 a 59	(Muguerza <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Lactococcus lactis</i>	Leche	NA	13***	(Rodríguez-Figueroa <i>et al.</i> , 2010)

*μM: Valores en unidades micromolar en el caso de péptidos que se conoce su secuencia de aminoácidos.

** μg/mL : Valores de IC₅₀ representados en microgramos por mililitro.

NA: No aplica.

*** ≤3 kDa

internos de la proteína. La hidrólisis enzimática puede ocurrir por medio de enzimas de origen animal, vegetal o microbiano. Esta se prefiere por encima de los métodos químicos debido al menor riesgo de reacciones adversas, además se puede controlar en mayor medida (Hernández-Ledesma, 2002).

Dentro de las enzimas de origen animal se encuentran las digestivas tales como pepsina del estómago y la tripsina y quimiotripsina del páncreas, sin embargo los péptidos obtenidos con estas enzimas han resultado con IC_{50} altos de hasta 1029 μM como se muestra en el cuadro 1.

Un ejemplo de hidrólisis por enzimas de origen vegetal es la proteasa D3 proveniente de la soya (*Glycine max*) para obtener hidrolizados de proteínas alimenticias tales como: aislado de proteína de soya, caseinato, gluten de trigo y suero de leche los valores de IC_{50} se muestran en el cuadro 1. El uso de esta enzima sobre suero de leche no resultó tan importante debido a que originaba hidrolizados con valores de IC_{50} superiores a hidrólisis con enzimas de otro origen como se puede observar en el cuadro 1.

En el cuadro 1 también se observan algunos ejemplos de la acción de enzimas de origen microbiano como termolisina, proteinasa k y su combinación. Se ha encontrado que las proteasas microbianas presentan valores mas bajos de IC_{50} que las enzimas digestivas de origen animal lo que sugiere una mejor eficiencia de las enzimas de origen bacteriano (Hernández-Ledesma *et al.*, 2002).

Existen mezclas comerciales de enzimas microbianas de grado alimenticio como lo son Flavourzyme y Alcalase 2.4L (Doucet *et al.*, 2003). Alcalase es una serina proteasa alcalina producida por *Bacillus licheniformis*, su principal componente es la enzima subtilisin Carlsberg también llamada subtilisin, subtilisin A, subtilopeptidasa A ó alcalase novo (Guntelberg y Ottesen,

1952). Es una cadena sencilla de 274 residuos de aminoácidos con un peso de 27277 Da, se inactiva por debajo de pH de 5 y por arriba de 11. Hidroliza uniones peptídicas preferentemente aquellas que poseen un residuo aromático (fenilalanina, tirosina o triptófano) en el lado carboxilo o residuos hidrofóbicos (posición P1) (Gupta *et al.*, 2002; Doucet *et al.*, 2003) . La hidrólisis de un aislado de suero de leche con la enzima alcalase hasta alcanzar un 10% de hidrólisis demostró tener un IC₅₀ de 0.68 mg/mL y al ser administrado de manera intraperitoneal a REH en una dosis de 1g/Kg de peso redujo la presión arterial sistólica a un promedio de 163.8 +/- 5.9 mmHg en comparación al control con un promedio de 188.5 +/- 9.3 mmHg resultando diferente a un nivel de probabilidad de 0.0018 (Costa *et al.*, 2005).

Flavourzyme por su parte es una mezcla de endoproteasas y exoproteasas producida por fermentación de *Aspergillus oryzae*, en donde la enzima mayoritaria es una carboxipeptidasa I la cual hidroliza tanto uniones donde estén presentes aminoácidos hidrofóbicos como básicos en posición P1 sin presentar preferencia por alguno de ellos, sin embargo cuando esta presente Pro o Gly la hidrólisis es menos favorecida (Blinkovsky *et al.*, 1999). Esta mezcla de enzimas es capaz de liberar tanto péptidos como aminoácidos. Las condiciones de trabajo de esta enzima son pH de 5 a 7 a 50°C (dos Santos *et al.*, 2011). El efecto de la enzima flavourzyme sobre suero de leche se ha estudiado para observar la actividad antioxidante de los hidrolizados (Peña-Ramos y Xiong, 2001; Dryáková *et al.*, 2010). Por su parte Goudarzi *et al.* (2012) estudiaron la obtención de hidrolizados con actividad tanto antioxidante como inhibidora de ECA a partir de la acción de flavourzyme obteniendo una inhibición de 74% de ECA y un grado de hidrólisis del 14.03% tras la digestión por 3.89 h a un pH de 6.04 y temperatura de 56.54°C.

Procesos fermentativos. Las bacterias fermentativas poseen un gran número de enzimas proteolíticas capaces de hidrolizar las proteínas lácteas liberando péptidos y aminoácidos, que le sirven como fuente de nitrógeno para su desarrollo. Las bacterias ácido lácticas que crecen en la leche desarrollan un sistema proteolítico capaz de liberar péptidos, cuya actividad dependerá de la secuencia de sus aminoácidos (Yamamoto, 1997). A su vez la obtención de péptidos con diferentes actividades dependerá de la especie y cepa del cultivo iniciador empleada en el proceso de fermentación.

2.4.3.3 Relación de la estructura de ECA con los compuestos inhibidores. Aunque no se ha elucidado por completo la forma de inhibición de la ECA por los péptidos alimenticios, se sabe que tiene que ver con la estructura y su interacción. Se ha encontrado que estos péptidos se componen por lo general de 2 a 12 aminoácidos.

El sitio activo de ECA esta conformado por tres subsitios S_1 , S_1' y S_2 , entre S_1 y S_1' se encuentra el ion $Zn(II)$ la coordinación de éste con los péptidos lo hace importante en la inhibición de la ECA (Ondetti y Cushman, 1982), la coordinación del $Zn(II)$ con el péptido es por medio del oxígeno del carbonilo formado de la unión de los aminoácidos del péptido, la cercanía del Zn con los péptidos dependerá de las interacciones hidrofóbicas de los aminoácidos del péptido con los de sitio de ECA (Jimsheena y Gowda, 2010) . Cushman *et al.* (1981) reportaron que los sitios S_1 , S_1' y S_2 tienen una fuerte afinidad por los aminoácidos hidrofóbicos triptófano, alanina y prolina respectivamente.

Por su parte López-Fandiño *et al.* (2006) indicaron que en C-terminal debe existir la presencia de un aminoácido hidrofóbico (principalmente prolina) y una carga positiva como lisina o arginina, así mismo Wu *et al.* (2006)

coincidieron en la presencia de prolina en C-terminal y agregaron que un aminoácido aromático también tiene interacción con estos sitios de unión, mencionó que el aminoácido con carga positiva debe estar en posición intermedia. Hee-GukSe-Kwon (2002) agregaron que en N-terminal puede existir aminoácidos alifáticos. Cuando en C-terminal exista un aminoácido aromático se hace indispensable una carga positiva adyacente a esté (Jimsheena y Gowda, 2010).

Jimsheena y Gowda (2010) observaron que al sustituir en el tripéptido IEY el amino ácido aromático tirosina por el amino ácido alifático prolina (IEP) se veía incrementada aun mas la inhibición de la ECA coincidiendo con lo dicho por Wu *et al.* (2006), respecto a que debe de haber un residuo aromático o Pro en el carboxilo terminal; además identificaron sobre este mismo péptido que al sustituir el amino ácido glutámico, E, por uno básico como lisina, K, (IKY) también aumentaba la inhibición de ECA, es decir, al ser sustituido por un aminoácido con carga positiva en posición intermedia. Aún más al sustituir ambos amino ácidos surgía un efecto sinergista aumentando el potencial inhibitorio de este péptido (IKP). En resumen, los péptidos con potencial antihipertensivo in-vitro poseen de 2 a 12 aminoácidos. En la secuencia C-terminal deben poseer un aminoácido hidrofóbico, aromático o prolina y la presencia de carga positiva en posición intermedia, mientras que en la secuencia N-terminal debe de existir un residuo alifático.

2.4.3.4 Estabilidad de péptidos inhibidores de ECA. Es importante que los péptidos liberados de las proteínas en los alimentos o los péptidos añadidos como ingrediente nutracéutico sean estables a cambios químicos durante el proceso final, empaclado y conservación; cambios en la estructura molecular a

nivel de aminoácido pueden modificar la bioactividad de los péptidos (López-Fandiño *et al.*, 2006).

Los péptidos pueden adoptar diferentes configuraciones conformacionales dependiendo de las condiciones del medio ambiente lo que podría afectar su actividad IECA. En un estudio realizado en el péptido DKIHP (proveniente de β -caseína) se encontró que al analizar la actividad IECA en un preparado con una única conformación (trans-pro) el IC_{50} es de 113.18 μ M y que este valor se incrementa a 577.92 μ M en un preparado con diferentes conformaciones, dos péptidos con posición trans-pro y uno con cis-pro (López-Fandiño *et al.*, 2006), se concluyó que los cambios conformacionales influyen en la actividad inhibidora de los péptidos.

Otro factor que puede intervenir en la actividad son los procesos térmicos, los cuales a un pH alcalino generan cambios en la estructura de aminoácidos. Por ejemplo, el calentamiento de Ala, Cys y fosfoserina a pH alcalino o 200 °C a un pH neutro, genera el residuo reactivo dehidroalanina. El tratamiento térmico enérgico en combinación con pH alcalino puede modificar la actividad inhibidora de ECA (Damodaran, 1996).

La oxidación de los aminoácidos es otro factor que puede influir en la desactivación de los péptidos. Se ven involucrados productos endógenos de la oxidación de compuestos en el alimento, tales como radicales libres y peróxidos, o el uso de agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno (López-Fandiño *et al.*, 2006). Estos cambios pueden ser inducidos durante el almacenamiento del producto terminado con un empaque inadecuado (Mestdagh *et al.*, 2005), por tanto es importante usar estrategias para proteger los péptidos de la oxidación.

Algunos son los factores que pueden afectar los péptidos, pero existen estrategias para protegerlos. Se ha descubierto que la proteína intacta de β -lactoglobulina puede funcionar como acarreador y protector a los péptidos bioactivos derivados de β -lactoglobulina. Se encontró que a pH 6.8 y 8.0, dependiendo de la temperatura y fuerza iónica, péptidos derivados de β -lactoglobulina interaccionan con la misma proteína intacta (Noiseux *et al.*, 2002). Por otro lado, éstos péptidos también pueden afectar las características sensoriales, por sus posibles sabores amargos (Pripp y Ardö, 2007; Cheung y Li-Chan, 2010). Una manera de adicionar estos péptidos sin afectar el sabor y al mismo tiempo proteger su actividad, es encapsularlos en sistemas acarreadores lipídicos, tales como liposomas o emulsión agua-en-aceite-en-agua. La encapsulación evita la percepción del sabor amargo y protege la degradación del péptido hasta que los lípidos protectores sean degradados y liberen los péptidos para que sean absorbidos en el torrente sanguíneo (Decker y Park, 2010).

2.4.4 Alimentos con Propiedades Antihipertensivas

Un alimento con propiedad antihipertensiva puede ser considerado como un alimento funcional, ya que éste estaría proporcionando beneficios adicionales a los nutricionales, disminuyendo el riesgo de padecer dicha enfermedad (Hasler, 1998).

Se han desarrollado diversos alimentos con propiedades antihipertensivas, algunos de estos se encuentran en el mercado, por ejemplo, leches fermentadas de las cuales se han obtenido péptidos con actividad antihipertensiva. Los microorganismos involucrados en la fermentación de estas

leches han sido *Lactobacillus helveticus* (Yamamoto y Takano, 1999), *Lactococcus lactis subsp. cremoris* (Gobbetti *et al.*, 2000) y *Enterococcus faecalis* (Quirós *et al.*, 2007; Pihlanto *et al.*, 2010)

Dentro del mercado se encuentran bebidas ya comerciales como lo es Calpis, bebida japonesa elaborada a partir de leche descremada fermentada con *Lactobacillus helveticus* CP790 y *Saccharomyces cerevisiae*. Este alimento fue capaz de inhibir el incremento de la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas (REH) siendo los péptidos Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro los responsables de la mayor actividad inhibidora de ECA (Nakamura *et al.*, 1995 a; Nakamura *et al.*, 1995 b). Evolus es una bebida láctea fermentada desarrollada por Valio en Finlandia, la cual ha demostrado que ayuda a reducir los niveles de presión elevada (Seppo *et al.*, 2003). Ameal es un hidrolizado de caseína que mostró reducir la presión arterial sistólica y que presentó los péptidos VPP e IPP (Mizuno *et al.*, 2005). Estas bebidas se encuentran a la venta como alimentos antihipertensivos.

También se han descrito péptidos que presentan actividad inhibidora de ECA durante el proceso de elaboración del queso mexicano (Torres-Llenez *et al.*, 2011) . Se observó que esta propiedad se desarrolla aun mas en el madurado de los quesos (Ryhänen *et al.*, 2001; Pripp *et al.*, 2006) obteniendo valores de IC₅₀ que van de 13.4 a 592 μ M (Pripp, Sørensen *et al.*, 2006). Se encontró que la secuencia de estos péptidos derivan de la caseína (Fitzgerald y Murray, 2006).

Otros alimentos que tienen esta actividad son fermentados de soya como pasta, salsa, natto y tempeh; así como quesos fermentados (Okamoto *et al.*, 1995; Shin *et al.*, 2001; Nakahara *et al.*, 2009). La salsa de soya fermentada fue probada tanto en REH y como aquellas que son susceptibles a la sal, en ambos casos se

mostraron diferencias, manifestándose en una reducción de la presión arterial respecto al control (Nakahara *et al.*, 2009), por lo que la presencia de sal en el producto no fue un obstáculo para que los compuestos inhibidores funcionaran. Por otro lado, se ha demostrado que la adición de hidrolizado de chía con un IC_{50} de $8.86\mu\text{g/mL}$ a una crema de zanahoria resultó con un potencial antihipertensivo in-vitro de $1.71\mu\text{g/mL}$ menor a su control de $27.67\mu\text{g/mL}$ (Segura-Campos *et al.*, 2012).

Los productos con actividad antihipertensiva disponibles en el mercado son de origen lácteo o fermentados en su mayoría. El área de los productos cárnicos ha iniciado con esta línea de investigación, se ha estudiado el potencial de proteínas cárnicas para la obtención de compuestos con potencial antihipertensivo, tal es el caso de la hidrólisis de proteínas de miosina (Arihara *et al.*, 2001) o troponina (Katayama *et al.*, 2007) de músculo de cerdo; así como de plasma sanguíneo.

También se ha encontrado actividad en productos curados como es el jamón seco-curado español donde una de las fracciones menores a 1.7 kDa fue administrada a REH reduciendo la presión arterial hasta 38.38 mmHg (Escudero *et al.*, 2012); o carne de puerco hidrolizada con un IC_{50} de 3.69 mg/mL mientras que su control, es decir carne sin hidrolizar presentó un IC_{50} mayor a $2000\mu\text{g/mL}$ (Ahhmed y Muguruma, 2010). Sin embargo, no se han hecho estudios sobre la aplicación de hidrolizados con actividad IECA en un producto cárnico, sin necesidad de que ocurra una proteólisis de la carne.

Controlar la presión arterial por medio de los alimentos es una buena estrategia para incrementar la salud y reducir los costos de cuidado médico. Los péptidos inhibidores de ECA han demostrado que pueden ser un ingrediente

nutracéutico y que pueden conferirle a un alimento funcionalidad. Tal es el caso de los productos lácteos que se mencionaron anteriormente los cuales explotan la actividad antihipertensiva. Sin embargo, no existe gran variedad de alimentos que posean como agente antihipertensivo dichos péptidos. Por lo anterior surge la necesidad de crear variedad de productos como podrían ser los productos cárnicos.

3. HIPÓTESIS

La adición de hidrolizado de suero de leche a un producto cárnico, proporciona actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Elaborar un producto cárnico con actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina, mediante el uso de hidrolizado de lactosuero como ingrediente.

4.2 Objetivos Específicos

1. Obtener las condiciones de hidrólisis para una solución de lactosuero con la finalidad de proporcionarle actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina.
2. Determinar la concentración de hidrolizado de lactosuero a utilizar en la elaboración del producto cárnico para proporcionarle un potencial antihipertensivo.
3. Evaluar el efecto del uso de hidrolizado sobre la calidad del producto cárnico y la actividad inhibidora de ECA durante el almacenamiento.

5. METODOLOGÍA

5.1 Materia Prima y Reactivos

Concentrado de suero de leche 8600 Hilmar™ (Hilmar, California, USA) enzima Alcalase 2.4L FG (Novodordisk Biochem, North Carolina, USA), enzima Flavourzyme 500 MG (Biotecsa, Estado de México, México) 2-mercaptoetanol (Thermo Scientific, Illinois 61101), estándar de amplio rango SDS-PAGE (BIO-RAD, California USA). o-ftalaldehído (OPA), serina, acetato de etilo, N-Hipuril-Histidil-Leucina y enzima convertidora de angiotensina (A6778-2UN) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Co (Missouri, USA).

5.2 Hidrólisis de Lactosuero

La hidrólisis del suero de leche fue vía enzimática, se realizaron 12 tratamientos diferentes, en donde se utilizaron las enzimas Alcalase 2.4L y Flavourzyme de manera independiente probándose a 6 tiempos diferentes de hidrólisis: 0, 15, 30, 60, 180 y 300. El procedimiento fue el siguiente: se disolvió el suero de leche hasta una concentración de proteínas del 5.7 % (el volumen de la muestra fue de 1 L), se sometió a un pre-tratamiento térmico, el cual consistió en un calentamiento en baño maría hasta los 90°C por 5 min, posteriormente se enfrió hasta los 50°C. El pH de la solución fue ajustada a 8.0 y 7.0 para Alcalase 2.4L y Flavourzyme respectivamente, con NaOH 5 M. La adición de enzima fue en

relación 1:100, enzima-proteína. La hidrólisis procedió en baño maría a una temperatura de 50 °C, tomando 80 mL de muestra a los 0, 15, 30, 60, 180 y 300 min finalizando la hidrólisis con un calentamiento a 90°C por 5 min, posteriormente las muestras fueron enfriadas en baño de hielo. Se reservó una porción de la muestra para el análisis de grado de hidrólisis y perfil electroforético. Del resto de la muestra se obtuvo el extracto soluble en agua mediante centrifugación a 21000 g a 10°C por 30 min, se recolectó la fase superior y se filtró en papel whatman #4. El extracto acuoso obtenido fue ultrafiltrado en filtro macrosep con un punto de corte de 3 kDa, se almacenó a -30 °C hasta el análisis de la actividad inhibidora de ECA.

5.3 Grado de Hidrólisis

La hidrólisis fue monitoreada por el método de o-ftaldehído (OPA) descrito por Nielsen *et al.* (2001). Donde OPA reacciona con los grupos amino libres en presencia de ditiotreitol, formando un compuesto colorido detectable a 340 nm, ver figura 2. El Ditiotreitol fue sustituido por 2-mercaptoetanol como lo describe el método de Church *et al.* (1983).

El reactivo de OPA se preparó el día del análisis, mezclando el tetraborato de sodio, el SDS (dodecil sulfato de sodio), el OPA disuelto en etanol y 2-mercaptoetanol.

La técnica consistió en mezclar 3 mL de OPA on 400 µL de la muestra. Se agitó y dejó reposar por 2 min, inmediatamente se leyó la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Spectronic™ GENESYS™ 5 Modelo 336001 (Thermo Electron Corporation, Wiaconsin, USA). Se realizó una curva estándar de serina

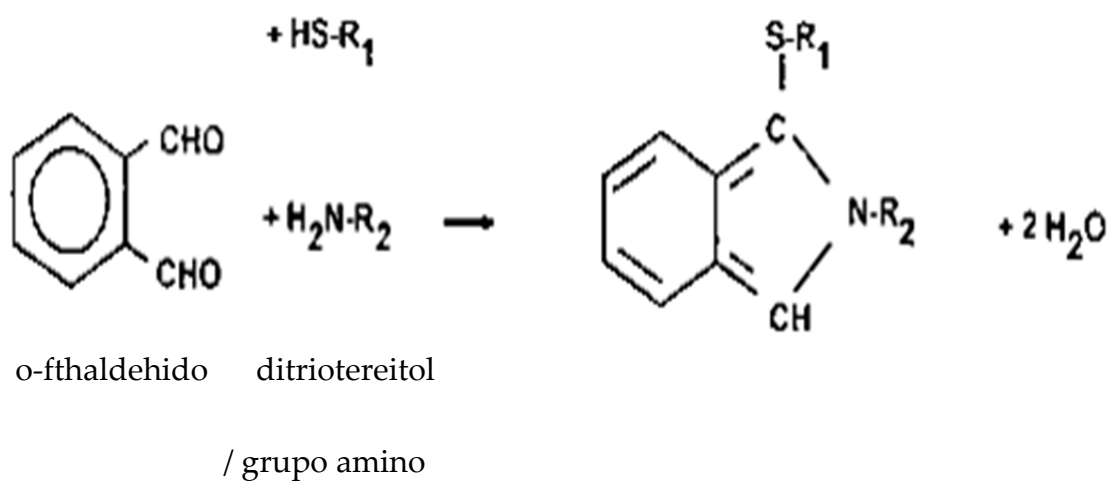


Figura 2. Reacción de OPA con grupos aminos libres

(0.01-0.2 mg/mL) correspondiente a 0.9515×10^4 - 1.9031×10^{-03} equivalentes de serina por litro de solución con una R^2 de 0.9993.

EL grado de hidrólisis (DH) se determinó como el porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados por medio de:

$$DH = h/h_{\text{tot}} * 100\% \quad (1)$$

En la mayoría de las proteínas el peso molecular promedio de los amino ácidos es de 125 g/mol, haciendo de h_{tot} 8 equivalentes por kg de proteína es decir que representa el número total de enlaces peptídicos por equivalentes de proteína (valor constante de 8.8 para suero) y h es el número de enlaces hidrolizados, este último valor se determinó por medio de:

$$h = (\text{Serine NH}_2 - \beta/\alpha) \quad (2)$$

$$h = \text{meqv/g} \quad (3)$$

Serine NH_2 meqv de serina por gramo de proteína, el cual se determinó por medio de la curva estándar y el contenido de proteína de la muestra. Valor β y α : son constantes propias de la proteína cruda, siendo estos 0.40 y 1.0 respectivamente para proteínas del suero (Nielsen *et al.*, 2001).

5.4 Perfil Electroforético

La hidrólisis de las principales proteínas del suero de leche β -lactoglobulina y α -lactoalbumina, fue observada por medio de electroforesis SDS-PAGE, siguiendo la metodología de Laemmli (1970), donde las condiciones fueron las siguientes: Gel de separación y gel concentrador al 16% y 4% de acrilamida,

respectivamente; el buffer de la corrida fue Tris-Base, Glicina y SDS; el estándar fue de amplio rango de Bio-rad.

La corrida se llevó a cabo a 80 y 150 v para el gel concentrador y el de separación, respectivamente; la tinción fue mediante una solución de azul de coomassie R-250 en metanol y ácido acético.

5.5 Actividad Inhibidora de la ECA en los Hidrolizados

La actividad inhibidora de ECA se determinó por la metodología de González-Córdova *et al.* (2010) modificado del método de (Cushman y Cheung, 1971) Previamente, la fracción menor a 3 kDa del extracto acuoso obtenido de los hidrolizados, fue ajustada a diferentes concentraciones de proteína bajo la metodología de Lowry *et al.* (1951), para determinar el valor de IC₅₀ mediante una extrapolación grafica de los porcentajes de inhibición de cada una de las muestras.

La metodología esta basada en la liberación del ácido hipúrico a partir de hippuril-histidil-Leucina (HHL) catalizada por la ECA. Se preparó una disolución 5 mM de HHL como sustrato, en tampón borato de sodio 100 mM y cloruro de sodio 300 mM, se ajustó el pH a 8.3 con ácido bórico. Se tomaron alícuotas de 100 µL de la disolución de HHL, los cuales fueron mezclados con 40 µL de muestra o con agua mili-Q para el caso de los testigos, se atemperaron los viales a 37°C por 30 min y se procedió a adicionar 20 µL de una solución de ECA (0.1 U/mL) al vial correspondiente.

La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 60 min y se frenó por la adición de 250 µL de ácido clorhídrico 1 M. El ácido hipúrico liberado durante la

reacción se extrajo con 1 mL de acetato de etilo por agitación en vortex durante 20 s, posteriormente se centrifugó a 1,500 g durante 10 min. De la fase superior se tomaron 0.750 mL y evaporaron a 85°C por un tiempo aproximado de 15 min. El residuo seco fue redissuelto en 1 mL de agua mili-Q agitado vigorosamente en vortex por 5 min, por último, se determinó su absorbancia a 228 nm en celda de cuarzo. Siguiendo esta metodología se determinó el IC₅₀ del fármaco captopril para verificar la eficacia de este análisis.

La inhibición de la ECA fue calculada de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad inhibidora de la ECA (\%)} = \left[1 - \frac{(C-D)}{(A-B)} \right] \times 100 \quad (4)$$

Donde:

A= Absorbancia del ácido hipúrico liberado en presencia de ECA, sin componente inhibidor. 100 µL Sustrato HHL + 40 µL Agua + 20 µL ECA.

B= Absorbancia sin el componente inhibidor o ECA. 100 µL Sustrato HHL + 40 µL Agua + 20 µL Agua.

C= Absorbancia del ácido hipúrico liberado tras la acción de la ECA en presencia de inhibidores. 100 µL Sustrato HHL + 40 µL Muestra + 20 µL ECA.

D= Absorbancia sin ECA y con componente inhibidor de ECA (Blanco de la muestra). 100 µL Sustrato HHL + 40 µL Muestra + 20 µL Agua.

5.6 Elaboración del Producto Cárnico

El sistema modelo consistió en un producto curado, embutido y cocinado, al cual se le incorporó lactosuero hidrolizado por el tratamiento con enzima

Alcalase 2.4L por 300 min, en forma líquida, con la finalidad de conferirle un potencial antihipertensivo. El lactosuero utilizado fue el hidrolizado por Alcalase 2.4L con un IC_{50} de 59.8 μ g. Las fórmulas se muestran en el cuadro 2.

La carne de cerdo fue limpiada y reducida en tamaño. Posteriormente se llevó a cabo la preparación del embutido en una cortadora Kila Vacum Autoc 30 (Kilia Co., Kiel, Alemania), donde se colocó la carne y mitad de hielo con la finalidad de reducir la temperatura, se adicionó la sal, condimentos, fosfatos, nitritos, hidrolizado de suero de leche, agua o suero sin hidrolizar según corresponda, fécula de papa, resto de hielo y por último el conservador, todo esto en constante movimiento.

La emulsión fue embutida en fundas de celulosa de 2 cm de diámetro y horneada en un horno Micro-Pak MP1000 (Enviro Pak, Oregon, 1569) hasta alcanzar los 72°C, las condiciones de cocción se observan en el cuadro 3. Posterior a la cocción, el producto se sometió a un baño de agua/hielo. Alcanzada una temperatura de 4°C fue pesado y conservado en bolsas de plástico a 4°C, para su análisis al día siguiente.

De los tratamientos anteriores se determinaron los parámetros físicos: Análisis de perfil de textura (APT) para el cual se cortó el producto en cilindros de 2 cm de diámetro y 3 cm de longitud, midiéndose los parámetros de dureza, elasticidad, cohesividad, resiliencia y masticabilidad en un texturómetro Texture Analyzer TAXT2 (Stable Micro System, Surrey GU7 1YL). Se realizó una doble compresión a un 50% de deformación y a una velocidad de 5 mm/s, con un tiempo de espera de 5 s entre cada compresión.

Para el análisis de esfuerzo al corte (WB) la muestra fue cortada al igual que en APT y analizada en el mismo equipo, utilizando como aditamento una

Cuadro 2. Ingredientes de los diferentes tratamientos.

Ingredientes	Control Agua	Control SSH¹	T 1	T 2	T 3
Carne de pierna de cerdo	59.74	52.52	57.34	54.921	52.52
SSNH ²	0.00	30	0.00	0.00	0.00
SSH ¹	0.00	0.00	10	20	30
Agua/Hielo	31.47	8.69	23.87	16.29	8.69
Grasa	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Sal	0.54	0.54	0.54	0.54	0.54
Condimento	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60
Fosfatos	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Sal cura	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Fécula de papa	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Eritorbato de sodio	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

¹SSH: Solución de Suero Hidrolizado.

²SSNH: Solución de Suero no hidrolizado. T: Tratamiento.

Cuadro 3. Ciclos de cocción del producto.

Ciclo	¹ BS / ² BH	Tiempo
	°F	Min
1	130/110	20
2	160/150	20
3	185/185	Hasta temperatura interna de 160°F

¹BS: Bulbo seco.

²BH: Bulbo húmedo.

navaja Warner Bratzler. La velocidad de la prueba fue 5 mm/s y un desplazamiento de 35 mm para asegurar que la navaja atravesara la muestra. El pico máximo registrado fue el que se tomo como fuerza resultante del esfuerzo al corte.

El color fue determinado bajo el sistema CIE $L^* a^* b^*$, mediante un colorímetro Minolta CR-300 (Minolta Camera Co., Osaka, Japón), tomando mediciones de la parte externa e interna registrando los valores de $L^* a^*$ y b^* , los cuales fueron transformados a valores de ángulo Hue y croma.

Para evaluar el potencial de hidrógeno se tomó lectura de 5 g de la muestra homogenizada con 45 mL de agua, en un potenciómetro Hanna (Hanna Instrument, Rhode Island, USA).

Previo a determinar la actividad inhibidora de ECA en el producto se obtuvo el extracto soluble en agua mediante homogenización de 120 g del producto con 120 mL de agua mili-Q haciendo uso de un ultraturrax a 13,500 rev/min por 1.5 min cuidando que no se elevará la temperatura. El material insoluble se separó en una centrifuga Beckman J2-21 (Beckman, Coulter, California, USA) a 14300 g usando el rotor JA-10 a 10°C por 30 min, la fase superior fue filtrada en papel Wathman #4. El extracto acuoso obtenido se ultrafiltró para obtener la fracción menor a 3kDa.

Se determinó la concentración en mg de la fracción menor a 3 kDa por gramo de producto, expresada como proteína bajo la metodología de Lowry *et al.* (1951). Finalmente la actividad inhibidora de ECA se determinó al igual que en los hidrolizados, detallado anteriormente, expresando el resultado como IC_{50} .

Se evaluó la actividad inhibidora de ECA en relación al tiempo, la cual se llevó a cabo sobre el tratamiento del producto cárnico que presentó el IC_{50} más

bajo, es decir sobre el producto que se le adicionó el 29.87% de hidrolizado. Se monitoreó mediante la determinación del IC_{50} del producto a lo largo del tiempo de almacenamiento, tomando muestras al día 1, 8, 15, 22 y 29. Además se midieron los parámetros pH, color, APT y esfuerzo al corte, como se describió anteriormente.

5.7 Análisis Estadístico

El análisis de los hidrolizados de suero de leche se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2X5, donde los factores fueron enzima y tiempo de hidrólisis. Los niveles para el factor enzima fueron Alcalase 2.4L y Flavourzyme, y para el factor tiempo fueron 0, 15, 30, 60, 180 y 300 min. La variable de respuesta fue la inhibición de la ECA expresada como IC_{50} y el grado de hidrólisis expresado en %.

La diferencia de los tratamientos en el producto cárnico y el monitoreo de la actividad inhibidora de ECA en relación al tiempo se analizó mediante un ANOVA de modelo lineal general con diseño completamente al azar.

La diferencia entre las medias de los tratamientos se determinó por medio de la prueba de Tukery-Kramer a un nivel de confianza del 95% en el paquete estadístico NCSS 2007.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Hidrolizados de Lactosuero

6.1.1 Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) fue determinado en las soluciones de suero de leche por las enzimas los resultados se observan en la figura 3 los valores obtenidos van de 4 a 24% dependiendo de la enzima. El GH se incrementó en el transcurso del tiempo 15, 30, 60, 180 y 300 min, comportamiento que se observó para ambas enzimas, cubriendo valores que van de 16 a 24% para Alcalase 2.4L y de 4 a 16% para Flavourzyme. Se observó que el porcentaje de hidrólisis generado con la enzima Alcalase 2.4L fue mayor ($p \leq 0.05$) a los valores obtenidos con la enzima Flavourzyme.

Wang *et al.* (2010) y Peña-Ramos y Xiong (2001) estudiaron el efecto de la Alcalase 2.4L sobre soluciones de suero de leche y reportaron GH similares a los obtenidos en el presente estudio, siendo 20% y 25% de hidrólisis, respectivamente. A su vez, Zhu *et al.* (2010), observaron la hidrólisis sobre huesos de albaricoque con la enzima Alcalase 2.4L obteniendo grados de hidrólisis mayores que con Flavourzyme, siendo 18 y 5% respectivamente.

Dentro de los factores que influyen en la respuesta de GH, se encuentra el tipo y especificidad de la enzima (Benítez *et al.*, 2008), por lo que las diferencias presentadas se atribuyen a estos factores. Ambas enzimas utilizadas son mezclas

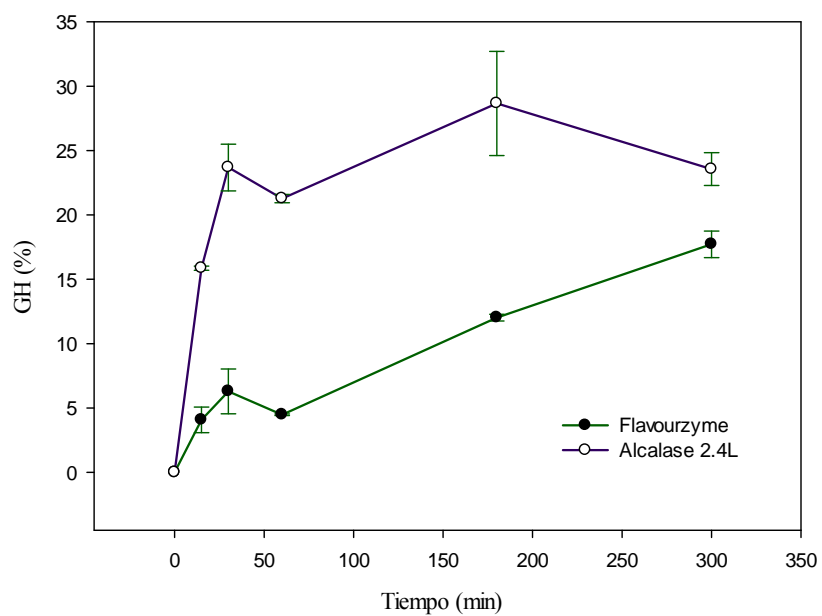


Figura 3. Grado de hidrólisis de soluciones de lactosuero hidrolizadas con las enzimas Alcalase 2.4L y Flavourzyme. El valor del control fue restado a cada muestra.

Media \pm Error estándar (n=2).

comerciales. Alcalase 2.4L es una mezcla de endoproteasas, con una amplia especificidad (Doucet *et al.*, 2003). Por su parte Flavourzyme es una mezcla de exoproteasas y endoproteasas, en donde la enzima mayoritaria es una carboxipeptidasa sin punto de corte específico. Esta mezcla es capaz no solo de liberar péptidos, sino, que al romper del exterior al interior libera aminoácidos, los cuales presentan menor actividad inhibidora de ECA en comparación con péptidos (Blinkovsky *et al.*, 1999). Es congruente que los hidrolizados con Flavourzyme presenten grados de hidrólisis menores a los de Alcalase 2.4L, debido a que no solo liberan péptidos si no aminoácidos.

Se ha reportado que a mayor GH, existe una mayor probabilidad de encontrar actividad inhibidora de ECA en los hidrolizados (Segura *et al.*, 2010). Además, se ha visto que hidrolizados con un GH mayor al 10% tienen una buena aplicación médica, ya que se considera que se obtiene compuestos de menor tamaño los cuales son de mejor absorción (Pedroche *et al.*, 2003). Se sugiere entonces que los hidrolizados con Alcalase 2.4L con grados de hidrólisis mayores al 10% podrían ser una buena opción si se desean utilizar con efectos terapéuticos.

6.1.2 Perfil Electroforético

El perfil electroforético de los hidrolizados se muestra en la figura 4. En el tiempo cero se pueden observar las bandas intactas de las principales proteínas del suero de leche, como lo son la β -lactoglobulina de 18 kDa y la α -lactoalbumina de 14 kDa, así como, la banda de albúmina de suero de 66 kDa.

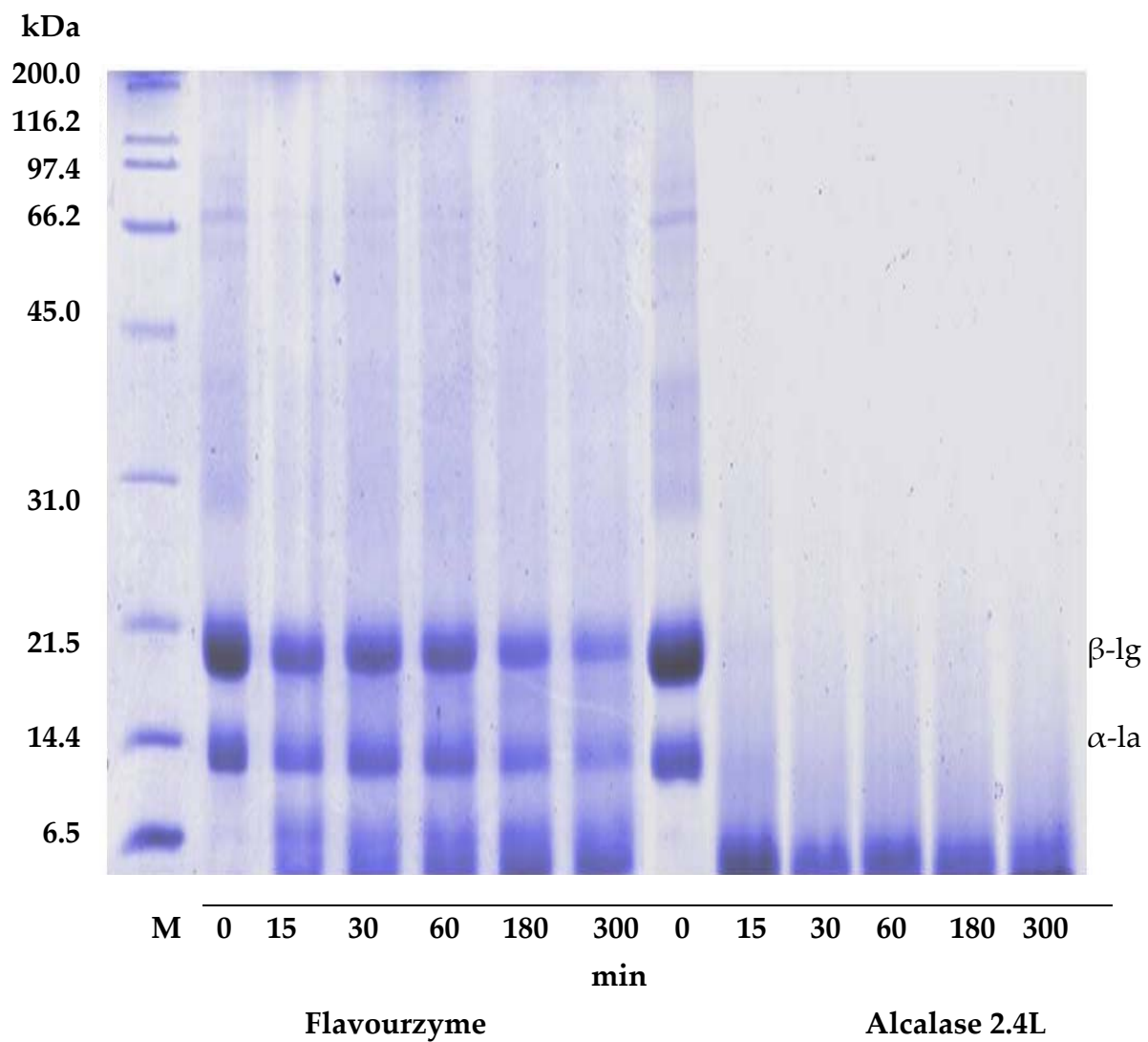


Figura 4. Gel de poliacrilamida-SDS de hidrolizados de lactosuero con las enzimas Flavourzyme y Alcalase 2.4L a los tiempos de hidrólisis de: 0, 15, 30, 60, 180 y 300min.

M: Marcador de Bio-rad de amplio rango.

Los hidrolizados con Flavourzyme, presentaron una desaparición gradual de bandas en relación con el tiempo, congruente con los valores de porcentaje de GH que se incrementan de la misma manera. En contraste, los hidrolizados con Alcalase 2.4L, presentaron una desaparición de bandas más drástica, se observó que a los 15 min de hidrólisis la banda de α -lactoalbumina es ligeramente visible, y en el resto de los tiempos existe una desaparición de bandas de las proteínas. A su vez, se encontró la aparición de bandas por debajo de los 6.5 kDa, resultado de los productos de la hidrólisis, sin lograr observar todos los productos menores a este peso, ya que pudieron eluirse fuera del gel.

6.1.3 Actividad Inhibidora de la Enzima Convertidora de Angiotensina

El potencial antihipertensivo de una muestra se puede determinar de manera *in-vitro* por medio de la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), la cual se expresa como porcentaje de inhibición o por medio del valor de IC_{50} , el cual hace referencia a la concentración mínima necesaria de la muestra para inhibir el 50% de la actividad de ECA.

En la figura 5, se muestra el porcentaje de inhibición de los extractos hidrolizados solubles en agua, estos sin ser fraccionados. Se observó que los porcentajes de inhibición más altos presentados fueron 85.69%, 87.14% y 82.33% para los extractos de Alcalase 2.4L a los 300 y 180 min y Flavourzyme a los 300 min respectivamente, sin ser diferentes entre ellos ($p>0.05$).

Por otro lado, la actividad IECA también dependerá de la especificidad de la enzima por el aminoácido de corte, ya que los péptidos que presentan mayor actividad IECA son aquellos que poseen en la posición carboxilo terminal

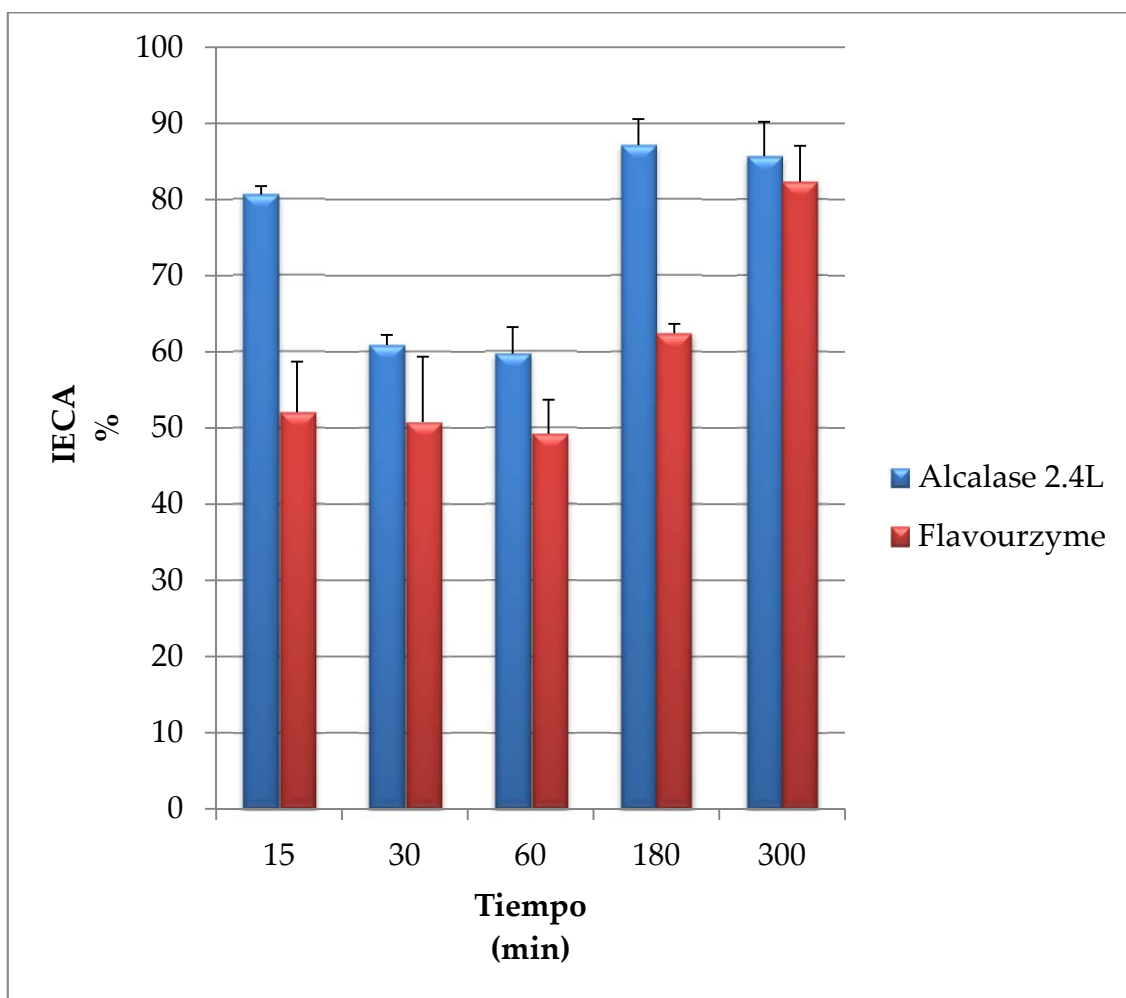


Figura 5. Porcentaje de inhibición de la ECA por extractos solubles en agua de lactosuero hidrolizado. Media \pm error estándar (n=2).

¹IECA: Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina.

sustratos hidrofóbicos, como lo pueden ser residuos de aminoácidos aromáticos o ramificados.

Aunque no se ha establecido por completo la relación entre la actividad IECA y la estructura de los péptidos inhibidores, se ha identificado tri y di péptidos que poseen los aminoácidos aromáticos triptófano, fenilalanina, tirosina o prolina en la posición C-terminal y aminoácidos de cadena alifática en N-terminal como buenos inhibidores de ECA (Cheung *et al.*, 1980; Hee-Guk y Se-Kwon, 2002; Li *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005).

La enzima Alcalase 2.4L aunque presenta una especificidad amplia por ser mezcla de enzimas, hidroliza la mayoría de los enlaces peptídicos con residuos aromáticos, por lo que sus productos podrían presentar la característica que les da la actividad inhibidora de ECA, por tanto esta enzima es buena para la generación de biopéptidos potencialmente antihipertensivos (Pedroche *et al.*, 2003).

Además, al ser una endoproteasa se evita la formación de amino ácidos libres lo que favorece la formación de péptidos. Los péptidos en comparación a los amino ácidos libres presentan mayor actividad IECA, por otra parte esta enzima posee la ventaja de ser de grado alimenticio (Doucet *et al.*, 2003).

Los valores obtenidos para porcentaje de inhibición de los extractos solubles sugieren que la enzima Alcalase 2.4L inhibe en mayor medida la ECA, sin embargo, estos datos deben de ser complementados con los valores de IC₅₀.

En el cuadro 4, se muestran los valores de IC₅₀ de los hidrolizados una vez fraccionados a un tamaño menor a 3 kDa. Se observa que los factores enzima y tiempo, así como su interacción fueron significativos sobre el valor de IC₅₀.

Cuadro 4. IC₅₀¹ y concentración de las fracciones menores a 3 kDa de los hidrolizados de lactosuero.

Enzima	Tiempo de hidrólisis (min)	IC ₅₀ (μg/mL) ²	Fracción <3 kDa (mg/mL) ³
Alcalase 2.4L	15	277.17 ^b	2.50 ^b
	30	69.82 ^a	2.65 ^b
	60	477.97 ^{cd}	2.41 ^b
	180	215.52 ^b	2.63 ^b
	300	59.80 ^a	3.08 ^b
Flavourzyme	15	649.06 ^e	0.453 ^a
	30	577.46 ^{de}	0.346 ^a
	60	527.27 ^{cde}	0.595 ^a
	180	449.92 ^{cd}	0.595 ^a
	300	423.00 ^c	0.853 ^a
EEM ⁴		25.2542	0.1640
Significancias:			
Enzima		**	**
Tiempo de hidrólisis		**	NS
E x T ⁵		**	NS

¹ Concentración necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina.

² Concentración de la fracción <3kDa por mL.

³ Concentración de la fracción <3kDa encontrada por ml del hidrolizado de lactosuero.

⁴EEM: Error estándar de la media.

⁵E x T: Interacción enzima y tiempo.

^{abcde} Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencia.

** (p≤0.01)

NS: No significativo.

Los valores de IC₅₀ para los hidrolizados con Alcalase 2.4L fueron de 277.17, 69.82, 477.97, 215.52 y 59.80 µg/mL, para los tiempos 15, 30, 60, 180 y 300 min respectivamente, los valores más bajos fueron para el tiempo de 60 y 30 min sin llegar a ser diferentes entre ellos.

Se observa que de los 30 a los 60 min el valor se incrementa de 277.17 a 477.97 µg/mL, después de este tiempo la tendencia es a la baja, por lo que se puede predecir que los péptidos formados a los 30 minutos no se mantuvieron, es decir fueron inestables, después de los 60 min se observa un claro comportamiento a la baja en el IC₅₀ siendo 477.97, 215.52 y 59.80 para los 60, 180 y 300 min, respectivamente. En los hidrolizados por Flavourzyme el comportamiento es a la baja todo el tiempo, sin embargo, no presenta valores tan bajos como los de los hidrolizados por Alcalase 2.4L.

En el cuadro 4 también se puede observar la concentración de péptidos de la fracción menor a 3 kDa de los hidrolizados, donde el factor determinante para presentar diferencias ($p \leq 0.05$) fue la enzima, ya que el factor tiempo y la interacción de los factores resultaron no significativos. Los valores más altos presentados fueron para los hidrolizados con Alcalase 2.4L con un promedio de 2.650 mg/mL siendo este valor más alto al promedio obtenido por los hidrolizados con Flavourzyme de 0.568 mg/mL.

Se considera que los péptidos de menor tamaño de 2 a 12 aminoácidos, son los que proporcionan mayor actividad inhibidora de ECA (Byun y Kim, 2001; Wu *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2010), por lo que el tener mayor concentración de la fracción menor a 3 kDa es favorable para la implementación en el producto cárnico.

Segura *et al.* (2010) encontraron que la fracción 3-5 kDa de hidrolizados de frijol de castilla tienen un IC₅₀ de 107 µg/mL a los 90 min de hidrólisis por Alcalase 2.4L. Por otro lado, Zhu *et al.* (2010) utilizando la misma enzima sobre proteínas de chabacano reportaron un IC₅₀ de 601 µg/mL sobre la fracción 1-5 kDa. Ambos valores fueron superiores a los encontrados en el presente estudio y posiblemente con más bajo potencial antihipertensivo.

Al comparar el valor de IC₅₀ obtenido por la acción de otras enzimas sobre proteínas de la leche se tiene que la acción de la proteasa D3 sobre suero de leche generó un IC₅₀ de 200 µg/mL valor obtenido por los hidrolizados sin fraccionar (Kodera y Nio, 2006), valor más alto y por tanto menos antihipertensivo que el encontrado en el presente estudio.

A partir de proteínas lácteas se han encontrado valores más bajos de IC₅₀ tal es el caso donde Hernández-Ledesma *et al.* (2007) hidrolizando lactoglobulina aisló los péptidos LQKW y LLF con un IC₅₀ de 19.90 y 31.24 µg/mL respectivamente ó proteinasa K obteniendo el péptido IPA con IC₅₀ de 25.97 µg/mL. Sin embargo, en estos ejemplos los hidrolizados están fraccionados hasta aislar los péptidos con mayor actividad antihipertensiva; por lo que se podría decir que se concentra la actividad antihipertensiva.

En el presente estudio se fraccionó solo hasta un tamaño menor a 3 kDa pero no se aislaron los péptidos, por lo que no se puede comparar de manera directa con los valores de péptidos aislados con la mayor actividad IECA. Se seleccionó el hidrolizado con Alacase 2.4L por 300 min para ser llevado a la segunda etapa: adición de lactosuero hidrolizado al producto cárnico.

6.2 Producto Cárnico

6.2.1 Actividad Inhibidora de ECA en el Producto Cárnico

En el cuadro 5 se presentan los valores de IC₅₀ obtenidos a partir de los extractos solubles en agua del producto cárnico de los diferentes tratamientos. Los valores más altos de IC₅₀ fueron para ambos controles CA y CS de 1548.25 µg/mL y 845.98 µg/mL, respectivamente. Por otro lado, los valores de IC₅₀ de los tratamientos T1, T2 y T3 fueron menores ($p \leq 0.05$), 401.60, 285.84 y 258.78 µg/mL, respectivamente. Es decir, los tratamientos presentaron valores más bajos que los controles, lo que indica que existe una capacidad potencial antihipertensiva en el producto cuando se le agrega hidrolizado de lactosuero, que presenta dicha cualidad, además el potencial antihipertensivo aumenta en el producto al incrementar la adición de suero lácteo hidrolizado en la formulación.

En el cuadro 5 también se presenta la concentración en mg de la fracción menor a 3kDa por gramo de producto. Se encontró un comportamiento congruente con la adición de suero de leche hidrolizado, es decir esta fracción se ve incrementada al adicionar suero de leche hidrolizado, 2.12, 2.58 y 2.83 mg/g para los tratamientos T1, T2 y T3, respectivamente.

Pese a la poca investigación sobre la adición de hidrolizados exógenos a productos alimenticios, se puede comparar con el trabajo de Segura-Campos *et al.* (2012), donde adicionaron hidrolizados de chía con un IC₅₀ de 8.86-44.01 µg/mL a dos productos, crema de zanahoria y pan. En la crema de zanahoria obtuvieron IC₅₀ de 0.24-1.71 µg/mL lo que indica un incremento de la actividad inhibidora de ECA con respecto al hidrolizado de chía, incremento que fue atribuido a la adición de lácteos (leche y mantequilla agregados en la

Cuadro 5. IC₅₀ y concentración de las fracciones menores a 3 kDa del producto ante los diferentes tratamientos.

Tratamiento	IC ₅₀ ¹ (µg/mL)	Fracción <3kDa ² (mg/g)
Control agua	1548.25 ^c	1.78 ^a
Control suero	845.98 ^b	1.64 ^a
1	401.60 ^a	2.12 ^b
2	285.84 ^a	2.58 ^c
3	258.78 ^a	2.83 ^c
EEM ³	50.56	0.0539
Significancia	**	**

¹ Concentración necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina.

² Concentración de la fracción < 3kDa por gramo de producto.

³EEM: Error estándar de la media.

^{abc} Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencia.

** (p≤0.01).

crema de zanahoria) con posible actividad antihipertensiva y al tratamiento térmico que pudo hidrolizar aun mas los hidrolizados incrementando la inhibición de ECA. Por otro lado en el pan obtuvieron IC_{50} de 141.29-297.68 $\mu\text{g/mL}$, el incremento en este valor lo atribuyeron a la fermentación ocurrida en la elaboración del pan y al tratamiento térmico (210°C por 25 min) para la cocción del pan.

En la presente investigación se adicionó al producto cárnico un hidrolizado con un IC_{50} de $59.80\mu\text{g/mL}$, resultando en un IC_{50} de 258.78-401.60 $\mu\text{g/mL}$ ya evaluado sobre el producto. La diferencia en este valor puede ser atribuida a una dilución de los hidrolizados con otros compuestos menores a 3 kDa que no poseen actividad inhibidora proveniente del resto de los ingredientes, cabe hacer notar que ambos controles presentan fracciones menores a este peso molecular aun sin adición de lactosuero hidrolizado.

6.2.2 Parámetros Físicos

Color. En el cuadro 6 se observan los valores de color tanto para la parte interna como externa del producto. Primero se describirán los valores de la parte interna. El valor para el parámetro L^* en CA fue de 76.21 siendo menor ($p<0.05$) al resto de los tratamientos 76.86, 77.86 y 78.52 para T1, T2 y T3 respectivamente. Valores más altos de L^* indican que el producto tiende a ser más claro. Se observó entre los tratamientos T1, T2 y T3 que al incrementar la concentración de suero hidrolizado la luminosidad aumenta.

Cuadro 6. Parámetros de color CIE-Lab, parte externa e interna del producto.

Tratamiento	Interna					Externa				
	L*	a*	b*	Angulo Hue	Croma	L*	a*	b*	Angulo Hue	Croma
Control agua	76.21 ^a	7.89 ^c	8.70 ^a	50.52 ^a	11.77 ^a	77.79 ^a	5.77 ^c	12.99 ^a	78.80 ^a	14.22 ^a
Control suero	77.81 ^c	7.66 ^{bc}	10.62 ^{bc}	62.32 ^b	12.92 ^b	78.69 ^{bc}	4.72 ^a	13.97 ^{bc}	83.53 ^d	14.85 ^b
1	76.86 ^b	7.00 ^b	10.38 ^b	65.80 ^b	12.66 ^b	77.71 ^b	5.55 ^{bc}	13.69 ^b	80.63 ^b	14.77 ^{ab}
2	77.86 ^c	6.97 ^{ab}	11.11 ^c	68.33 ^{bc}	13.16 ^{bc}	78.49 ^b	5.40 ^{bc}	14.24 ^{bc}	81.79 ^{bc}	15.24 ^b
3	78.52 ^d	6.15 ^a	12.20 ^d	75.28 ^c	13.66 ^c	79.54 ^c	5.12 ^c	14.44 ^c	82.80 ^{cd}	15.33 ^b
EEM ¹	0.1463	0.1987	0.2501	1.7545	0.1201	0.1122	0.1428	0.1442	0.3118	0.1511
Significancia	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**

¹EEM: Error estándar de la media.

^{abc} Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencia

**($p \leq 0.01$).

El parámetro a^* determinó que la parte interna tiende ligeramente al rojo siendo el CA el que presentó el valor mas alto 7.89, sin ser diferente del CS de 7.66. Se observó que este parámetro disminuye al incrementar la concentración de suero hidrolizado, 7.00, 6.97 y 6.15; esta diminución se atribuye a la adición de suero de leche el cual posee una tonalidad amarilla.

Para el parámetro b^* se observó que la parte interna presenta valores mas altos respecto a los controles, tendiendo ligeramente a amarillo. El mas bajo fue para el CA de 8.70 diferente ($p < 0.05$) al resto de los tratamientos, que presentaron valores superiores con tendencia al amarillo, siendo 10.38, 11.11 y 12.20 para T1, T2 y T3, respectivamente.

El color verdadero del producto representado por el ángulo Hue fue entre rojo y amarillo. El valor del CA 50.52 es diferente ($p < 0.05$) al resto de los tratamientos que van de 65.80 a 75.28, esto puede deberse a que el suero de leche presentó una tonalidad amarilla. Cabe señalar que los tratamientos no fueron diferentes al CS, por lo que el ligero cambio presentado en este valor no es significativo a la vista.

En el presente estudio los valores de croma o intensidad de color se encuentran entre los valores de los dos controles, es decir no presentaron diferencias respecto a alguno de los dos controles.

Valores de color de la parte externa. Los valores de los tratamientos para el parámetro L^* fueron iguales al menos a uno de los dos controles, por lo que se considera que la adición de suero de leche hidrolizado no afectó este parámetro. El valor de b^* mas bajo fue para el CA de 12.99 y al igual que en la parte interna este valor fue incrementándose al aumentar el suero hidrolizado en los tratamientos. En cuanto al valor verdadero, el CA presentó un valor de 78.80

diferente a los tratamientos T1, T2 y T3, que presentaron valores más altos, es decir más cercanos a amarillo, debido a la adición de suero independientemente de si fuera o no hidrolizado ya que estos mismos tratamientos no presentaron diferencia respecto al CS.

Tanto en la parte interna como externa del producto, los cambios en el color fueron pocos pero significativos, aunque estas diferencias no fueron perceptibles al ojo humano. Algo similar encontraron Yetim *et al.* (2001) en salchichas tipo frankfruter donde la sustitución de agua 25 al 100% por suero de leche líquido no afectó el color sus resultados fueron de 8.56 a 8.70 en una escala sensorial.

Los resultados obtenidos coincidieron con los obtenidos en albóndigas de res las cuales mostraron reducción del color rojo e incremento de la luminosidad, al sustituir proteína cárnica por proteína de suero de leche (Youssef y Barbut, 2011) .

Por su parte Hayes *et al.* (2005) estudiaron el efecto de la adición de diferentes fracciones de suero de leche en un 3% y observaron que los valores para los tratamientos del valor a^* iban de 6.1 a 8.6 mientras que el control obtuvo 7.7, en el valor de L fue de 58.5 a 61.4 y el control 59.2; y para el valor de b^* fue de 9.8 a 11.9 y para el control de 12.3, los valores no se alejaron mucho de los valores obtenidos para el control por lo que el uso de este ingrediente no repercutió en gran medida en el color del producto, como ocurrió en el presente trabajo.

Galaviz (2000) reportó para salchichas comerciales mexicanas valores de L de 41.27 a 57.33, mientras que los valores de L en el presente estudio fueron superiores (77.71-79.54); para el valor de a^* de salchichas comerciales fue de 7.80

a 14.45, en el presente estudio fueron valores más bajos (4.72 a 5.77); para el valor de b^* los valores de los productos comerciales fue de 10.43-13.10 lo aquí reportados oscilan entre 12.99 - 14.44. Por tanto se observan diferencias entre los valores comerciales y el producto obtenido ya que este último es de mayor luminosidad, menos rojo y ligeramente más amarillos, sin embargo estas diferencias también las presentan los controles por lo que ajustes en la formulación podrían modificar estos valores.

En el cuadro 7 se muestran los resultados de pH y rendimiento (%). El rendimiento no presentó diferencias ($p>0.5$). Mientras que en los valores de pH del CA fue diferente al resto, y entre ellos no hubo diferencia ($p>0.5$). Yetim *et al.* (2001) tampoco observaron cambios en el pH al incrementar la sustitución de agua por suero de leche, sustitución de 25 hasta un 100%.

El análisis de perfil de textura y esfuerzo al corte se muestran en el cuadro 8. Donde se observó una reducción ($p<0.05$) en la dureza al incrementar la adición de suero de leche hidrolizado, 3.59, 3.28 y 3.14 Kgf para T1, T2 y T3, respectivamente. El valor más alto fue para el CA, 3.71 Kgf, sin ser diferente ($p>0.05$) al CS o T1.

No existió efecto sobre la elasticidad, ya que los tratamientos no muestran diferencia entre ellos y ante los controles ($p>0.05$).

El valor más alto presentado de cohesividad fue para el CA 0.7350 y el más bajo de 0.7167 para el CS. Los valores de T1, T2 y T3, presentaron un incremento en ese orden, sin llegar a ser tan alto como CA o tan bajo como CS.

En resiliencia, los tratamientos resultaron ser iguales a alguno de los dos controles por lo que los valores de los tratamientos quedan dentro del rango de los dos controles.

Cuadro 7. Valores de pH y porcentaje de rendimiento de los diferentes tratamientos.

Tratamiento	pH	%Rendimiento
Control Agua	6.31 ^a	91.66 ^a
Control Suero	6.36 ^b	93.73 ^a
1	6.36 ^b	92.83 ^a
2	6.38 ^b	94.98 ^a
3	6.38 ^b	92.89 ^a
EEM ¹		
Significancia	**	NS

¹EEM: Error estándar de la media.

^{ab} Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencia

**($p \leq 0.01$).

NS: No significativo.

Cuadro 8. Análisis de perfil de textura y esfuerzo al corte del producto de los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Análisis de perfil de textura					Esfuerzo al Corte Kgf
	Dureza Kgf	Elasticidad	Cohesividad	Resilencia	Masticabilidad	
Control Agua	3.71 ^c	0.9172	0.7350 ^b	0.3992 ^{ab}	2.5054 ^b	2.233 ^c
Control Suero	3.39 ^{ac}	0.9099	0.7167 ^a	0.3892 ^a	2.2066 ^a	1.445 ^{ab}
1	3.59 ^{bc}	0.9140	0.7176 ^a	0.3904 ^a	2.358 ^{ab}	1.644 ^b
2	3.28 ^{ab}	0.9137	0.7184 ^a	0.3926 ^{ab}	2.154 ^a	1.434 ^{ab}
3	3.14 ^a	0.9147	0.7277 ^{ab}	0.4033 ^b	2.095 ^a	1.280 ^a
EEM ¹	0.0965	0.0012	0.0034	0.0030	0.0642	0.0645
Significancia	**	NS	**	*	**	**

¹EEM: Error estándar de la media.

^{abc} Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencia

*(p≤0.05)

** (p≤0.01)

NS: No significativo

En el esfuerzo al corte, se observó una diferencia de cerca de 1 Kgf entre los controles, siendo de 2.233 y 1.445 Kgf para el CA y CS respectivamente. Esto nos dice que al agregar suero de leche la textura disminuye. Este patrón se mantuvo entre los tratameintos; al aumentar la cantidad de lactosuero hidrolizado en la formulación, el esfuerzo al corte disminuyó 1.644, 1.434 y 1.280 Kgf para T1, T2 y T3 respectivamente.

Los valores promedios de esfuerzo al corte reportados por Galaviz (2000) en salchichas comerciales fueron de 0.81 a 2.12 KgF, por lo que los valores de los controles como los tratamientos estuvieron dentro del rango de estos productos.

Lyons *et al.* (1999) estudiaron la reducción de grasa en una salchicha de puerco sustituyeron la grasa por un “pre-gel” elaborado de concentrado de suero de leche, tapioca y carragenina en niveles de 0 hasta 12%. Notaron una reducción en fuerza al incrementar la concentración de proteínas “en forma de pre-gel”.

Andic *et al* (2010) observaron que al adicionar suero de leche en polvo en un 1 y 2% en hamburguesas mostraban 5.87 y 5.36 N de fuerza comparados con el control de 6.08 N, mientras que en un análisis sensorial no se encontraron diferencias en la elasticidad (promedio de 3.93), a pesar de que el equipo fue capaz de encontrar ligeras diferencias el panel no logro encontrarlas.

En el presente estudio el suero hidrolizado fue sometido a un pre-tratamiento térmico antes de ser hidrolizado y posterior adición al producto cárnico, este calentamiento del lactosuero según YoussefBarbut (2011) debió proporcionarle características de gel. Bajo esta afirmación la adición del hidrolizado con el previo calentamiento no debió reducir los valores de textura en el producto, esto bajo el supuesto de que el hidrolizado estaba formando un

semigel y no se estaba añadiendo en forma completamente líquida, sin embargo, esto no ocurrió así. La disminución en los valores de dureza y esfuerzo al corte en los tratamientos, pudo atribuirse a la hidrólisis llevada a cabo por las enzimas (Ferreira *et al.*, 2007) lo que hizo que no se formara el gel en la porción de proteínas que estaban hidrolizadas. Es probable que la hidrólisis que sufrieron las proteínas del suero de leche haya disminuido la capacidad de las proteínas del lactosuero para formar estructuras de gel.

El producto cárnico sustituido en un 30% por suero de leche hidrolizado, fue utilizado como producto de estudio a lo largo del tiempo, ya que proporcionó una mayor actividad inhibidora de ECA en comparación al resto de los tratamientos; por otra parte, no hubo diferencias sobre los parámetros físicos que pudieran percibirse como una mala calidad del producto.

6.2.3 Actividad Inhibidora de ECA durante el almacenamiento.

En el cuadro 9 se presentan los valores de IC_{50} sobre la actividad inhibidora de ECA por un período de 28 días con un muestreo de cada 7 días. Se observa que no hubo diferencia significativa durante el tiempo de almacenamiento, presentando un promedio de IC_{50} 184.7 $\mu\text{g/mL}$. La concentración de la fracción menor a 3 kDa se mantuvo igual ($p > 0.05$) durante el almacenamiento, mostrando un promedio de 2.37 $\mu\text{g/mL}$. Se infiere que el potencial antihipertensivo no se ve afectado a lo largo del tiempo de almacenamiento, y que la concentración de la fracción que aporta esta actividad tampoco se ve disminuida.

Cuadro 9. IC₅₀ y concentración de las fracciones menores a 3 kDa del producto del tratamiento 3 a lo largo del tiempo.

Día	IC ₅₀ ¹ (µg/mL)	Fracción <3kDa ² (mg/g)
1	192.12	2.14
8	192.78	2.42
15	172.01	2.44
22	173.12	2.42
29	193.47	2.50
EEM ³	15.2442	0.1677
Significancia	NS	NS

¹ Concentración necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina.

² Concentración de la fracción < 3 kDa por gramo de producto.

³EEM: Error estándar de la media.

NS: No significativo.

En contraste RamchandranShah (2010) observaron que la actividad IECA de un yogurt fue variable durante su almacenamiento por 28 días a 4 °C presentando valores de IC₅₀ de 3.05, 1.29, 1.48, 2.94 y 1.27 µg/mL a tiempo 1,7, 14, 21 y 28 días, respectivamente. Esta variación fue atribuida a una posible actividad proteolítica que continuaba en el yogurt. A diferencia del yogurt, el producto cárnico del presente estudio resultó con actividad IECA estable.

A pesar de que en el mercado aun no se ofertan productos cárnicos con actividad antihipertensiva, se han realizado estudios sobre la posibilidad de que esta actividad se produzca de manera endógena durante el proceso de elaboración. Por ejemplo, en el laboratorio de Escudero *et al.* (2012) se ha estudiado la IECA en el jamón español seco-curado. Se comprobó que péptidos aislados del jamón tenían actividad antihipertensiva sobre ratas espontáneamente hipertensas. Dicha reducción se atribuye al péptido RPR (IC₅₀ 382 µM) proveniente de nebulina y a los péptidos KAPVA (IC₅₀ 46.56 µM) y PTPVP (IC₅₀ 256.41 µM) de titina ocasionada por las enzimas gástricas pepsina y pancreatina (Escudero *et al.*, 2010). Sin embargo, este producto tiene características organolépticas diferentes a las del producto tipo salchicha producto menos costoso y de mayor consumo en la población mexicana (Cárnico, 2011).

6.2.4 Parámetros Físicos Durante el Almacenamiento

En el cuadro 10 se presentan los valores de color de la capa externa e interna de producto durante su almacenamiento. En la parte interna la luminosidad o valor L* resultó diferente ($p \leq 0.05$) durante el almacenamiento ocurriendo una disminución de este parámetro, sin embargo no es perceptible al

Cuadro 10. Parámetros de color CIE-Lab del tratamiento 3 a lo largo del tiempo.

Día	Interna					Externa				
	L*	a*	b*	Angulo Hue	Croma	L*	a*	b*	Angulo Hue	Croma
0	74.77 ^b	8.44	10.58	57.38	13.54	75.94	5.41 ^a	14.38 ^a	81.79 ^b	15.37 ^a
8	74.45 ^{ab}	8.53	10.65	57.14	13.66	76.49	5.37 ^a	14.54 ^a	82.05 ^b	15.51 ^a
15	74.26 ^{ab}	8.65	10.79	57.02	13.85	76.45	5.47 ^a	14.63 ^b	82.03 ^b	15.69 ^b
22	73.98 ^a	8.82	10.47	54.62	13.70	76.14	5.62 ^{ab}	13.97 ^a	80.72 ^{ab}	15.06 ^a
29	74.08 ^a	8.78	10.65	55.67	13.83	76.07	6.03 ^b	14.09 ^a	79.53 ^a	15.34 ^a
EEM ¹	0.1590	0.1412	0.1122	1.2484	0.0712	0.1632	0.1135	0.1574	0.4283	0.1454
Significancia	*	NS	NS	NS	0.043	NS	**	**	**	*

¹EEM: Error estándar de la media.

^{abc} Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencia

*(p≤0.05)

** (p≤0.01)

NS: No significativo.

ojo humano. Por su parte los valores de los parámetros a^* y b^* resultaron iguales ($p>0.05$). La diferencia en el valor de croma es atribuido al cambio en la luminosidad. En la parte externa, el valor L^* no presentó cambios, mientras que los valores a^* y b^* fueron diferentes ($p\leq 0.01$) entre los tratamientos, ocurriendo un ligero incremento en el valor a^* y variaciones en el valor b^* . El ángulo Hue o color verdadero se vio reducido debido a las diferencias en color.

En el cuadro 11 se observa el comportamiento del pH a lo largo del tiempo donde se observó una ligera disminución de este valor ya que en el día 1 presentaba un pH de 6.52 y en el día 29 este había bajado a 6.20, la reducción aunque significativamente diferente no indica que hubiera un deterioro importante del producto.

En el cuadro 12 se observan los resultados del análisis de perfil de textura y esfuerzo al corte. Los parámetros de textura dureza, elasticidad, cohesividad, resiliencia y masticabilidad no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$) a lo largo del tiempo, lo que significa que el producto es estable.

En cuanto al parámetro de esfuerzo al corte, se muestra una tendencia a incrementarse hasta el día 22 ya que al día 29 hubo una reducción en este valor sin embargo esta diferencia ($p\leq 0.05$) tan pequeña entre los tratamientos no es fácilmente reconocida entre los consumidores.

Como resumen del comportamiento a lo largo del tiempo del producto, no ocurrieron variaciones en la actividad inhibidora de ECA, hubo cambios en el color, reducción en el pH, y no se presentaron cambios en la textura del producto. Estos resultados apuntan a que el producto posee potencial antihipertensivo y que dicho potencial no se ve afectado durante su almacenamiento

Cuadro 11. Potencial de hidrógeno del producto del tratamiento 3 a lo largo del tiempo.

Día	pH
1	6.52 ^c
8	6.49 ^c
15	6.38 ^b
22	6.20 ^a
29	6.20 ^a
EEM ¹	0.0186
Significancia	**

¹EEM: Error estándar de la media.

** (p<0.01).

^{abc} Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencia.

Cuadro 12. Análisis de perfil de textura y esfuerzo al corte del producto del tratamiento 3 a lo largo del tiempo.

Día	Análisis de perfil de textura					Esfuerzo al Corte Kgf
	Dureza Kgf	Elasticidad	Cohesividad	Resilencia	Masticabilidad	
1	3.41	0.9185	0.7291	0.3920	2.27	1.06
8	3.31	0.9155	0.7345	0.3987	2.32	1.18
15	3.96	0.9154	0.7323	0.3951	2.67	1.21
22	3.50	0.9111	0.7387	0.3901	2.44	1.26
29	3.81	0.9148	0.7300	0.3891	2.48	1.17
EEM ¹	0.1527	0.0034	0.0067	0.0074	0.1004	0.0385
Significancia	NS	NS	NS	NS	NS	0.0099

EEM¹: Error estándar de la media.

NS: No significativ

7. CONCLUSIONES

El hidrolizado de suero con mayor potencial antihipertensivo fue el hidrolizado utilizando Alcalase 2.4L por 300 min ya que se presentó un IC_{50} de 59.80 $\mu\text{g/mL}$ en el hidrolizado y mayor recuperación de la fracción menor a 3 kDa siendo de 3.08 mg/mL.

La incorporación de suero hidrolizado al producto cárnico, incrementó la actividad IECA de un IC_{50} de 1548.25 para el control agua a 258.78 $\mu\text{g/mL}$ para el tratamiento con incorporación del 30% de lactosuero hidrolizado y a su vez no se presentaron diferencias físicas respecto al producto que se le adicionó suero sin hidrolizar. Los resultados aquí mostrados indican que la utilización de hidrolizados de suero es factible para la producción de una salchicha con características similares a las que se encuentran en las tiendas de autoservicio.

El comportamiento del producto durante el almacenamiento indica que no hay pérdida de la actividad inhibidora de ECA y a su vez no existen diferencias físicas relevantes que pudieran indicar un detrimento en la calidad del product. Por lo anterior, se sugiere continuar el presente estudio con análisis básicos como es la identificación de los péptidos que aportan la mayor actividad IECA y análisis in vivo para confirmar la actividad antihipertensiva.

8. REFERENCIAS

- Abubakar A., Saito T., Kitazawa H., Kawai Y. and Itoh T. (1998). Structural Analysis of New Antihypertensive Peptides Derived from Cheese Whey Protein by Proteinase K Digestion. *Journal of dairy science* 81(12): 3131-3138.
- Ahhmed A. M. and Muguruma M. (2010). A review of meat protein hydrolysates and hypertension. *Meat Science* 86(1): 110-118.
- Aleixandre A., Miguel M. and Muguerza B. (2008). Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de leche y huevo. *Nutrición Hospitalaria* 23: 313-318.
- Arihara K., Nakashima Y., Mukai T., Ishikawa S. and Itoh M. (2001). Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Science* 57(3): 319-324.
- Ascherio A., Hennekens C., Willett W. C., Sacks F., Rosner B., Manson J., Witteman J. and Stampfer M. J. (1996). Prospective study of nutritional factors, blood pressure, and hypertension among US women. *Hypertension* 27(5): 1065-1072.
- Benítez R., Ibarz A. and Pagan J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica clínica latinoamericana* 42: 227-236.
- Biesalski H. K. (2005). Meat as a component of a healthy diet – are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet? *Meat Science* 70(3): 509-524.
- Blinkovsky A. M., Byun T., Brown K. M. and Golightly E. J. (1999). Purification, Characterization, and Heterologous Expression in *Fusarium venenatum* of a Novel Serine Carboxypeptidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology* 65(8): 3298-3303.
- Byun H.-G. and Kim S.-K. (2001). Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Process Biochemistry* 36(12): 1155-1162.

- Cardoso C., Mendes R. and Nunes M. L. (2008). Development of a healthy low-fat fish sausage containing dietary fibre. *International Journal of Food Science & Technology* 43(2): 276-283.
- Cárnico M. L. y. (2011). "Estadísticas seleccionadas de la industria cárnica en México." Retrieved 25 de octubre, 2012, from http://www.alimentariaonline.com/media/MLC043_esca.pdf.
- Cicardi M., Zingale L. C., Bergamaschini L. and Agostoni A. (2004). Angioedema Associated With Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Use: Outcome After Switching to a Different Treatment. *Arch Intern Med* 164(8): 910-913.
- Costa E. L., Almeida A. R., Netto F. M. and Gontijo J. A. R. (2005). Effect of intraperitoneally administered hydrolyzed whey protein on blood pressure and renal sodium handling in awake spontaneously hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 1817-1824.
- Cushman D. W. and Cheung H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology* 20(7): 1637-1648.
- Cushman D. W., Cheung H. S., Sabo E. F. and Ondetti M. (1981). Angiotensin converting enzyme inhibitors: Evolution of a new class of antihypertensive drugs; in *Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors*. Z. P. Horovitz. Baltimore, Maryland, Urban & Schwarzenberg, Inc.: 3-25.
- Cheung H.-S., Wang F.-L., Ondetti M. A., Sabo E. F. and Cushman D. W. (1980). Binding of peptide substrate and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *The Journal of Biological Chemistry* 255(2): 401-408.
- Cheung I. W. Y. and Li-Chan E. C. Y. (2010). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity and bitterness of enzymatically-produced hydrolysates of shrimp (*Pandalopsis dispar*) processing byproducts investigated by Taguchi design. *Food Chemistry* 122(4): 1003-1012.
- Chin K. B., Keeton J. T., Miller R. K., Longnecker M. T. and Lamkey J. W. (2000). Evaluation of Konjac Blends and Soy Protein Isolate as Fat Replacements in Low-fat Bologna. *Journal of Food Science* 65(5): 756-763.
- Church F. C., Swaisgood H. E., Porter D. H. and Catignani G. L. (1983). Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. *Journal of dairy science* 66(6): 1219-1227.
- Damodaran S. (1996). *Amino Acids, Peptides, and Proteins. Food Chemistry*. O. R. Fennema. Madison, Marcel Dekker, Inc.

- Dean D. (2001). Asphyxia due to angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor mediated angioedema of the tongue during the treatment of hypertensive heart disease. *Journal of Forensic Sciences* 46(5): 5.
- Decker E. A. and Park Y. (2010). Healthier meat products as functional foods. *Meat Science* 86(1): 49-55.
- Demeyer D., Honikel K. and De Smet S. (2008). The World Cancer Research Fund report 2007: A challenge for the meat processing industry. *Meat Science* 80(4): 953-959.
- Desmond E. (2006). Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat Science* 74(1): 188-196.
- dos Santos S., Martins V., Salas-Mellado M. and Prentice C. (2011). Evaluation of Functional Properties in Protein Hydrolysates from Bluewing Searobin (<i>Prionotus punctatus) Obtained with Different Microbial Enzymes. *Food and Bioprocess Technology* 4(8): 1399-1406.
- Doucet D., Otter D. E., Gauthier S. F. and Foegeding E. A. (2003). Enzyme-Induced Gelation of Extensively Hydrolyzed Whey Proteins by Alcalase: Peptide Identification and Determination of Enzyme Specificity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(21): 6300-6308.
- Dryáková A., Pihlanto A., Marnila P., Čurda L. and Korhonen H. T. (2010). Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. *European Food Research and Technology* 230(6): 865-874.
- Enari H., Takahashi Y., Kawarasaki M., Tada M. and Tatsuta K. (2008). Identification of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from salmon muscle and their antihypertensive effect. *Fisheries Science* 74(4): 911-920.
- Escudero E., Aristoy M.-C., Nishimura H., Arihara K. and Toldrá F. (2012). Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham. *Meat Science* 91(3): 306-311.
- Escudero E., Sentandreu M. A. n. and Toldrá F. (2010). Characterization of Peptides Released by in Vitro Digestion of Pork Meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(8): 5160-5165.
- Fernández-Ginés J. M., Fernández-López J., Sayas-Barberá E. and Pérez-Alvarez J. A. (2005). Meat Products as Functional Foods: A Review. *Journal of Food Science* 70(2): R37-R43.
- Ferreira I. M. P. L. V. O., Pinho O., Mota M. V., Tavares P., Pereira A., Gonçalves M. P., Torres D., Rocha C. and Teixeira J. A. (2007). Preparation of ingredients containing an ACE-inhibitory peptide by tryptic hydrolysis of whey protein concentrates. *International Dairy Journal* 17(5): 481-487.

- Fisher N., Allan D., Kifor I., Gaboury C., Williams G., Moore T. and Hollenberg N. (1994). Responses to converting enzyme and renin inhibition. Role of angiotensin II in humans. *Hypertension* 23(1): 44-51.
- Fitzgerald R. J. and Murray B. A. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology* 59(2): 118-125.
- FitzGerald R. J., Murray B. A. and Walsh D. J. (2004). Hypotensive Peptides from Milk Proteins. *The Journal of Nutrition* 134(4): 980S-988S.
- Galaviz F. D. (2000). Desarrollo y Optimización de Formulación de Salchichas de Avestruz. Ciencias Químico Biológicas. Hermosillo, Sonora, Universidad de Sonora. **Licenciatura:** 86.
- Gobbetti M., Ferranti P., Smacchi E., Goffredi F. and Addeo F. (2000). Production of Angiotensin-I-Converting-Enzyme-Inhibitory Peptides in Fermented Milks Started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(9): 3898-3904.
- González-Córdova A. F., Torres-Llanez M. J., Rodríguez-Figueroa J. C., Espinosa-de-los-Monteros J. J., García H. S. and Vallejo-Córdova B. (2010). Actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina en leches fermentadas con cepas de *Lactobacillus*.
- Goudarzi M., Madadlou A., Mousavi M. and Emam-Djomeh Z. (2012). Optimized preparation of ACE-inhibitory and antioxidative whey protein hydrolysate using response surface method. *Dairy Science & Technology* 92(6): 641-653.
- Guàrdia M. D., Guerrero L., Gelabert J., Gou P. and Arnau J. (2008). Sensory characterisation and consumer acceptability of small calibre fermented sausages with 50% substitution of NaCl by mixtures of KCl and potassium lactate. *Meat Science* 80(4): 1225-1230.
- Guntelberg A. V. and Ottesen M. (1952). Preparation of Crystals containing the Plakalbumin-forming Enzyme from *Bacillus subtilis*. *Nature* 170(4332): 802-802.
- Gupta R., Beg Q. and Lorenz P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59(1): 15-32.
- Hasler C. M. (1998). Functional foods: Their role in disease prevention and health promotion. *Food Technology* 52: 8.
- Hatanaka A., Miyahara H., Suzuki K. I. and Sato S. (2009). Isolation and Identification of Antihypertensive Peptides from Antarctic Krill Tail Meat Hydrolysate. *Journal of Food Science* 74(4): H116-H120.

- Hayes J. E., Desmond E. M., Troy D. J., Buckley D. J. and Mehra R. (2005). The effect of whey protein-enriched fractions on the physical and sensory properties of frankfurters. *Meat Science* 71(2): 238-243.
- He F. and Mac Gregor G. (2002). Effect of modest salt reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized trials. Implications for public health. *Journal of Human Hypertension* 16: 761-770.
- Hee-Guk B. and Se-Kwon K. (2002). Structure and activity angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from alaskan pollack skin. *Biochemistry and molecular Biology* 35(2): 239-243.
- Hernández-Ledesma B. (2002). Caracterización y Bioactividad de Péptidos Obtenidos a Partir de Proteínas Lácteas Mediante Hidrólisis Enzimática y Procesos Fermentativos. Nutrición y Bromatología II. Madrid, Universidad Complutense de Madrid. **Doctor**: 230.
- Hernández-Ledesma B., Miguel M., Amigo L., Aleixandre M. A. and Recio I. (2007). Effect of simulated gastrointestinal digestion on the antihypertensive properties of synthetic β -lactoglobulin peptide sequences. *Journal of Dairy Research* 74(03): 336-339.
- Hernández-Ledesma B., Recio I., Ramos M. and Amigo L. (2002). Preparation of ovine and caprine [beta]-lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine [beta]-lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *International Dairy Journal* 12(10): 805-812.
- Hernández B. (2002). Caracterización y bioactividad de péptidos obtenidos a partir de proteínas lácteas mediante hidrólisis enzimática y procesos fermentativos. Nutrición y Bromatología II. Madrid, Universidad Complutense de Madrid. **Doctor**.
- Honikel K.-O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science* 78(1-2): 68-76.
- Horita C. N., Morgano M. A., Celeghini R. M. S. and Pollonio M. A. R. (2011). Physico-chemical and sensory properties of reduced-fat mortadella prepared with blends of calcium, magnesium and potassium chloride as partial substitutes for sodium chloride. *Meat Science* 89(4): 426-433.
- Huynh N. T. and Tayek J. A. (2002). Oral Arginine Reduces Systemic Blood Pressure in Type 2 Diabetes: Its Potential Role in Nitric Oxide Generation. *J Am Coll Nutr* 21(5): 422-427.
- Jiménez-Colmenero F., Carballo J. and Cofrades S. (2001). Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Science* 59(1): 5-13.
- Jimsheena V. K. and Gowda L. R. (2010). Arachin derived peptides as selective angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitors: Structure-activity relationship. *Peptides* 31(6): 1165-1176.

- Juárez M. (2006). "Alimentos funcionales. La evaluación de las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos." Retrieved Septiembre, 2012, from http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/otras_actividades/UIIMP_seg_alimentaria_nutricion/M_Juarez.pdf.
- Katayama K., Anggraeni H. E., Mori T., Ahhmed A. M., Kawahara S., Sugiyama M., Nakayama T., Maruyama M. and Muguruma M. (2007). Porcine Skeletal Muscle Troponin Is a Good Source of Peptides with Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Activity and Antihypertensive Effects in Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(2): 355-360.
- Kearney P. M., Whelton M., Reynolds K., Muntner P., Whelton P. K. and He J. (2005). Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *The Lancet* 365(9455): 217-223.
- Khosh F. and Khosh M. (2001). Natural approach to hypertension. *Altern Med Rev* 6(6): 590-600.
- Kodera T. and Nio N. (2006). Identification of an Angiotensin I-converting Enzyme Inhibitory Peptides from Protein Hydrolysates by a Soybean Protease and the Antihypertensive Effects of Hydrolysates in 4 Spontaneously Hypertensive Model Rats. *Journal of Food Science* 71(3): C164-C173.
- Korhonen H. and Pihlanto A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal* 16(9): 945-960.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 5.
- Leckie B. J. (2005). Targeting the renin-angiotensin system: what's new? *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 3(1): 23-32.
- Li G.-H., Le G.-W., Shi Y.-H. and Shrestha S. (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition research* (New York, N.Y.) 24(7): 469-486.
- Li G. H., Le G. W., Liu H. and Shi Y. H. (2005). Mung-bean Protein Hydrolysates Obtained with Alcalase Exhibit Angiotensin I-converting Enzyme Inhibitory Activity. *Food Science and Technology International* 11(4): 281-287.
- López-Fandiño R., Otte J. and van Camp J. (2006). Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal* 16(11): 1277-1293.

- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and R.J.Randall (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of biology and chemistry* 193: 265-275.
- Lyons P. H., Kerry J. F., Morrissey P. A. and Buckley D. J. (1999). The influence of added whey protein/carrageenan gels and tapioca starch on the textural properties of low fat pork sausages. *Meat Science* 51(1): 43-52.
- Mestdagh F., De Meulenaer B., De Clippeleer J., Devlieghere F. and Huyghebaert A. (2005). Protective Influence of Several Packaging Materials on Light Oxidation of Milk. *Journal of dairy science* 88(2): 499-510.
- Mizuno S., Matsuura K., Gotou T., Nishimura S., Kajimoto O., Yabune M., Kajimoto Y. and Yamamoto N. (2005). Antihypertensive effect of casein hydrolysate in a placebo-controlled study in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. *British Journal of Nutrition* 94(01): 84-91.
- Muguerza B., Ramos M., Sánchez E., Manso M. A., Miguel M., Aleixandre A., Delgado M. A. and Recio I. (2006). Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *International Dairy Journal* 16(1): 61-69.
- Mullally M. M., Meisel H. and FitzGerald R. J. (1997). Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin. *FEBS letters* 402(2): 99-101.
- Murray C. J. and Lopez A. D. (1997). Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349(9063): 1436-1442.
- Nakahara T., Sano A., Yamaguchi H., Sugimoto K., Chikata H., Kinoshita E. and Uchida R. (2009). Antihypertensive Effect of Peptide-Enriched Soy Sauce-Like Seasoning and Identification of Its Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Substances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(2): 821-827.
- Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K., Okubo A., Yamazaki S. and Takano T. (1995 b). Purification and Characterization of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitors from Sour Milk. *Journal of dairy science* 78(4): 777-783.
- Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K. and Takano T. (1995 a). Antihypertensive Effect of Sour Milk and Peptides Isolated from It That are Inhibitors to Angiotensin I-Converting Enzyme. *Journal of dairy science* 78(6): 1253-1257.
- Narambuena C. F., Ausar F. S., Bianco I. D., Beltramo D. M. and Leiva E. P. M. (2004). Aggregation of Casein Micelles by Interactions with Chitosans: A

- Study by Monte Carlo Simulations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(2): 459-463.
- Nielsen P. M., Petersen D. and Dambmann C. (2001). Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science* 66(5): 642-646.
- Noiseux I., Gauthier S. F. and Turgeon S. L. (2002). Interactions between Bovine β -Lactoglobulin and Peptides under Different Physicochemical Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(6): 1587-1592.
- Novellla G. B. (2008). Inhibidores de renina. *Revista Peruana de Cardiología* 34(2): 129-138.
- Okamoto A., Hanagata H., Matsumoto E., Kawamura Y., Yukimichi K. and Yanagida F. (1995). Angiotensin I converting enzyme inhibitory activities of various fermented foods. *Bioscience, biotechnology and biochemistry* 59(6): 3.
- OMS (2009). Global Health risk Mortality and burden of disease attributable to selected major risks, World Health Organization.
- OMS (2011) "Hypertension Fact Sheet."
- Ondetti M. and Cushman D. (1982). Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annual review of biochemistry* 51: 283-308.
- Paassen P. V., Zeeuw D. D., Jong P. E. D. and Navis G. (2000). Renin Inhibition Improves Pressure Natriuresis in Essential Hypertension. *Journal of the American Society of Nephrology* 11(10): 1813-1818.
- Pearson A. M. and Gillett T. A. (1996). Processed Meats. New York, Chapman & Hall.
- Pedroche J., Yust M. M., Girón-Calle J., Vioque J., Alaiz M. and Francisco M. (2003). Plant protein hydrolysates and tailor-made foods. *Electronic journal of environmental, agricultural and foods chemistry* 2(1): 233-235.
- Peña-Ramos E. A. and Xiong Y. L. (2001). Antioxidative Activity of Whey Protein Hydrolysates in a Liposomal System. *Journal of dairy science* 84(12): 2577-2583.
- Pihlanto-Leppala, Auml A., Koskinen P., IVI, Piilola K., Pasela T. and Korhonen H. (2000). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research* 67(01): 53-64.
- Pihlanto A., Virtanen T. and Korhonen H. (2010). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *International Dairy Journal* 20(1): 3-10.

- Pripp A. H. and Ardö Y. (2007). Modelling relationship between angiotensin-(I)-converting enzyme inhibition and the bitter taste of peptides. *Food Chemistry* 102(3): 880-888.
- Pripp A. H., Sørensen R., Stepaniak L. and Sørhaug T. (2006). Relationship between proteolysis and angiotensin-I-converting enzyme inhibition in different cheeses. *LWT - Food Science and Technology* 39(6): 677-683.
- Quirós A., Ramos M., Muguerza B., Delgado M. A., Miguel M., Aleixandre A. and Recio I. (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal* 17(1): 33-41.
- Ramchandran L. and Shah N. P. (2010). Characterization of functional, biochemical and textural properties of synbiotic low-fat yogurts during refrigerated storage. *LWT - Food Science and Technology* 43(5): 819-827.
- Rees D. D., Palmer R. M. and Moncada S. (1989). Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86(9): 3375-3378.
- Roberfroid M. B. (2000). Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *The American Journal of Clinical Nutrition* 71(6): 1660s-1664s.
- Rodríguez-Figueroa J. C., Reyes-Díaz R., González-Córdova A. F., Troncoso-Rojas R., Vargas-Arispuro I. and Vallejo-Córdova B. (2010). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk fermented by wild and industrial *Lactococcus lactis* strains. *Journal of dairy science* 93(11): 7.
- Ryhänen E.-L., Pihlanto-Leppälä A. and Pahkala E. (2001). A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *International Dairy Journal* 11(4-7): 441-447.
- Sacks F. M., Svetkey L. P., Vollmer W. M., Appel L. J., Bray G. A., Harsha D., Obarzanek E., Conlin P. R., Miller E. R., Simons-Morton D. G., Karanja N., Lin P.-H., Aickin M., Most-Windhauser M. M., Moore T. J., Proschan M. A. and Cutler J. A. (2001). Effects on Blood Pressure of Reduced Dietary Sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) Diet. *New England Journal of Medicine* 344(1): 3-10.
- Sadler M. J. (2004). Meat alternatives — market developments and health benefits. *Trends in Food Science & Technology* 15(5): 250-260.
- Saito T., Abubakar A., Itoh T., Arai I. and Aimar M. (1997). Development of a new type of fermented cheese whey beverage with inhibitory effects against angiotensin-converting enzyme. *Tohoku Journal of Agricultural Research* 48: 8.

- Salud S. d. (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-122-SSA1-1994, Bienes y servicios. Productos de la carne. Productos cárnicos curados y cocidos, y curados y emulsionados y cocidos. Especificaciones sanitarias.
- Segura-Campos M. R., Salazar-Vega I. M., Chel-Guerrero L. A. and Betancur-Ancona D. A. (2012) "Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods." LWT - Food Science and Technology DOI: 10.1016/j.lwt.2012.07.017.
- Segura M. R., Chel L. A. and Betancur D. A. (2010). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions extracted by ultrafiltration of cowpea *Vigna unguiculata* hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(14): 2512-2518.
- Seppo L., Jauhiainen T., Poussa T. and Korpela R. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition* 77(2): 326-330.
- Seppo L., Jauhiainen T., Poussa T. and Korpela R. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition* 77(2): 326-330.
- Shin Z.-I., Yu R., Park S.-A., Chung D. K., Ahn C.-W., Nam H.-S., Kim K.-S. and Lee H. J. (2001). His-His-Leu, an Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptide Derived from Korean Soybean Paste, Exerts Antihypertensive Activity in Vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(6): 3004-3009.
- SINAISb (2010). Principales causas de mortalidad general por entidad federativa, 2008. D. G. d. I. e. Salud.
- Singh R. B., Niaz M. A., Rastogi S. S., Shukla P. K. and Thakur A. S. (1999). Effect of hydrosoluble coenzyme Q10 on blood pressures and insulin resistance in hypertensive patients with coronary artery disease. *Journal of human hypertension* 13(3): 203-208.
- Steffen L. M., Kroenke C. H., Yu X., Pereira M. A., Slattery M. L., Van Horn L., Gross M. D. and Jacobs D. R. (2005). Associations of plant food, dairy product, and meat intakes with 15-y incidence of elevated blood pressure in young black and white adults: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 82(6): 1169-1177.
- Thorin E., Shreeve S. M., Thorin-Trescases N. and Bevan J. A. (1997). Reversal of Endothelin-1 Release by Stimulation of Endothelial α_2 -Adrenoceptor Contributes to Cerebral Vasorelaxation. *Hypertension* 30(4): 830-836.

- Torres-Llanaez M. J., González-Córdova A. F., Hernandez-Mendoza A., Garcia H. S. and Vallejo-Cordoba B. (2011). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in Mexican Fresco cheese. *Journal of dairy science* 94(8): 3794-3800.
- Troy D. J. and Kerry J. P. (2010). Consumer perception and the role of science in the meat industry. *Meat Science* 86(1): 214-226.
- Vollmer W. M., Sacks F. M., Ard J., Appel L. J., Bray G. A., Simons-Morton D. G., Conlin P. R., Svetkey L. P., Erlinger T. P., Moore T. J., Karanja N. and Group f. t. D.-S. T. C. R. (2001). Effects of Diet and Sodium Intake on Blood Pressure: Subgroup Analysis of the DASH-Sodium Trial. *Annals of Internal Medicine* 135(12): 1019-1028.
- Wang L., Mao X., Cheng X., Xiong X. and Ren F. (2010). Effect of enzyme type and hydrolysis conditions on the in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and ash content of hydrolysed whey protein isolate. *International Journal of Food Science & Technology* 45(4): 807-812.
- Wilburn A. J., King D. S., Glisson J., Rockhold R. W. and Wofford M. R. (2004). The Natural Treatment of Hypertension. *The Journal of Clinical Hypertension* 6(5): 242-248.
- Wood J. D., Enser M., Fisher A. V., Nute G. R., Sheard P. R., Richardson R. I., Hughes S. I. and Whittington F. M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science* 78(4): 343-358.
- Wu J., Aluko R. E. and Muir A. D. (2008). Purification of angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides from the enzymatic hydrolysate of defatted canola meal. *Food Chemistry* 111(4): 942-950.
- Wu J., Aluko R. E. and Nakai S. (2006). Structural Requirements of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides: Quantitative Structure-Activity Relationship Study of Di- and Tripeptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(3): 732-738.
- Wu J. and Ding X. (2002). Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Research International* 35(4): 367-375.
- Yamamoto N. (1997). Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Peptide Science* 43(2): 129-134.
- Yamamoto N. and Takano T. (1999). Antihypertensive peptides derived from milk proteins. *Food / Nahrung* 43(3): 159-164.
- Yetim H., Müller W. D. and Eber M. (2001). Using fluid whey in comminuted meat products: effects on technological, chemical and sensory properties of frankfurter-type sausages. *Food Research International* 34(2-3): 97-101.

- Youssef M. K. and Barbut S. (2011). Effects of two types of soy protein isolates, native and preheated whey protein isolates on emulsified meat batters prepared at different protein levels. *Meat Science* 87(1): 54-60.
- Zarco P. (2001). Inhibidores de la ECA y antagonistas AII en la insuficiencia cardíaca. *Cardiovascular risk factors* 10(1): 25-34.
- Zhang W., Xiao S., Samaraweera H., Lee E. J. and Ahn D. U. (2010). Improving functional value of meat products. *Meat Science* 86(1): 15-31.
- Zhu Z., Qiu N. and Yi J. (2010). Production and characterization of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernel protein hydrolysate. *European food research and technology = Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung. A* 231(1): 13-19.