

Antihypertensive activity of zein peptides extracted from creole corn (*Zea mays* L.) (blue and red) from the State of Mexico

Actividad antihipertensiva de péptidos de zeína extraídos de maíz (*Zea mays* L.) criollo (azul y rojo) del Estado de México

García-Campos, Alan Uriel¹; Díaz-Ramírez, Mayra¹; Calderón-Domínguez Georgina²; Cruz-Monterrosa, Rosy Gabriela¹; Rayas-Amor, Adolfo Armando¹; Jiménez-Guzmán, Judith¹; Guadarrama-Lezama, Andrea Yazmín³; Salgado-Cruz Ma. de la Paz^{2,4}; García-Garibay, Mariano¹; León-Espinosa, Erika Berenice^{1*}

¹Departamento de Ciencias de la Alimentación. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Lerma. Av. de las Garzas 10. Col. El Panteón, Lerma de Villada, Estado de México. C. P. 52005. ²Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Av. Wilfrido Massieu Esq. Cda. Miguel Estampa s/n, Gustavo A. Madero, Ciudad de México. C. P. 07738, ³Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Tollocan esq. Paseo Colón s/n, Toluca, Estado de México. C. P. 50120. ⁴Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Cd. de México, México
*Autor de correspondencia: e.leon@correo.ler.uam.mx

ABSTRACT

Objective: To evaluate the antihypertensive activity of peptides extracted from nixtamalized and non-nixtamalized creole corn (blue and red) zein from the State of Mexico.

Design/methodology/approach: Bioinformatic tools, such as the NCBI database, were used to search for primary sequences of the maize zein protein. The methodology included a prediction of peptides with antihypertensive activity through various bioinformatic servers. Inhibitory activity was determined by percentage regression. Statistical analysis was performed to assess possible significant differences using the Tukey test ($p \leq 0.05$).

Results: The following peptides were found by *in silico* hydrolysis: IFSILMLLA, LSACVLDATI, TASVCENPTL, LPLSPLLFQQ, SPALSIVQSL, LSPYSQQQQF, PFSQLATAY, LPFYQQFSAN and PAAFYQQHII that showed inhibition activity. The results showed that the grade of hydrolysis (GH) was higher in blue corn (13.96 ± 0.02) than in red corn (10.38 ± 0.79) without nixtamalization, while, with the nixtamalization process, this parameter was also higher in blue corn (10.52 ± 0.57) than in red corn (8.96 ± 0.01).

Study limitations/implications: The enzyme used for hydrolysis generates oligopeptides that may not be as closely related to the angiotensin-converting enzyme.

Findings/Conclusions: *In vitro* antihypertensive activity of unhydrolyzed blue corn zein showed a lower percentage of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition compared to unhydrolyzed red corn. Trypsin hydrolysis only increases ACE inhibitory activity in blue corn at a concentration of 0.3 mg/mL without nixtamalizing.

Key words: corn, nixtamalization, grade of hydrolysis, angiotensin-converting enzyme (ACE).

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la actividad antihipertensiva de péptidos extraídos de zeína de maíz criollo azul y rojo nixtamalizado y sin nixtamalizar del Estado de México.



Agroproductividad: Vol. 13, Núm. 7, julio. 2020. pp: 87-93.

Recibido: enero, 2020. **Aceptado:** junio, 2020.

Diseño/metodología/aproximación: Se emplearon herramientas bioinformáticas, tales como la base de datos NCBI para la búsqueda de secuencias primarias de la proteína zeína del maíz. La metodología incluyó una predicción de los péptidos con actividad antihipertensiva a través de diversos servidores bioinformáticos. La actividad inhibitoria se determinó mediante la regresión del porcentaje. Se realizó un análisis estadístico para evaluar las posibles diferencias significativas utilizando la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Resultados: Por medio de la hidrólisis *in silico* se encontraron los siguientes péptidos: IFSILMLLA, LSACVLDATI, TASVCENPTL, LPLSPLLF-QQ, SPALSLVQSL, LSPYSQQQGF, PFSQLATAY, LPFYQQFSAN y PAA-FYQQHII que mostraron actividad de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Los resultados mostraron que el grado de hidrólisis (GH) de la zeína fue mayor en maíz azul (13.96 ± 0.02) que en maíz rojo (10.38 ± 0.79) sin nixtamalizar, mientras que, con el proceso de nixtamalización, este parámetro también fue mayor en el maíz azul (10.52 ± 0.57) que en el maíz rojo (8.96 ± 0.01).

Limitaciones del estudio/implicaciones: La enzima utilizada para la hidrólisis enzimática genera oligopéptidos que tal vez no puedan ser tan afines a la enzima convertidora de angiotensina.

Hallazgos/conclusiones: La actividad antihipertensiva *in vitro* del maíz azul sin hidrolizar mostraron un menor porcentaje de inhibición de la ECA con respecto al maíz rojo sin hidrolizar. La hidrólisis con tripsina solo incrementa la actividad inhibitoria de la ECA en maíz azul a concentración de 0.3 mg/mL sin nixtamalizar.

Palabras clave: maíz, nixtamalización, grado de hidrólisis, enzima convertidora de angiotensina (ECA).

farmacológico, se sabe que un estilo de vida saludable, es decir, realizar una cierta cantidad de actividad física y adoptar un plan de alimentación correcto, como reducir la ingesta de sodio y moderar el consumo de alcohol, junto con otros hábitos saludables, es de vital importancia para prevenir la hipertensión y mantener la presión sanguínea, lo que conduce a la reducción del riesgo cardiovascular (Krousel-Wood *et al.*, 2004). La Organización Mundial de la Salud (OMS) menciona que independientemente del nivel de presión arterial, todas las personas deben adoptar modificaciones apropiadas en el estilo de vida. Por otro lado, es importante aumentar el conocimiento del consumidor sobre el vínculo entre la dieta y la salud, incrementando la conciencia y la demanda de ingredientes alimentarios funcionales para evitar efectos secundarios indeseables asociados con el consumo (Saleh *et al.*, 2016). Dentro de la categoría de alimentos funcionales se encuentran los péptidos bioactivos que se han definido como fragmentos específicos de proteínas que tienen un impacto positivo en las funciones o condiciones del cuerpo y pueden influir en la salud (Sánchez y Vázquez, 2017). La composición y secuencia de aminoácidos determina la actividad de los péptidos una vez que se liberan de la proteína precursora donde se encriptan (Fields *et al.*, 2009), éstos pueden ser activados por estrategias durante el procesamiento de alimentos como la hidrólisis enzimática o fermentación, digestión gastrointestinal, o por la combinación de diferentes métodos (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011). Múltiples condiciones como la especificidad de la enzima, tiempo de hidrólisis, grado de hidrólisis, relación enzima/sustrato y secuencia de aminoácidos,

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en todo el mundo con muchos factores de riesgo asociados como diabetes, niveles altos de colesterol, obesidad, envejecimiento y presión arterial alta (Malaguti *et al.*, 2014). En el mundo, las ECV son responsables de aproximadamente 17 millones de muertes por año. Entre ellas, las complicaciones de la hipertensión causan anualmente 9.4 millones de muertes. La presión arterial alta o hipertensión se definen médicamente como presión arterial elevada repetidamente que excede 140/90 mm Hg (Achelrod *et al.*, 2015). El sistema renina angiotensina-aldosterona (RAS) es responsable de regular la presión sanguínea y el equilibrio de líquidos (Arshad *et al.*, 2019). Dos enzimas principales, la renina y la enzima convertidora de angiotensina (ECA), desempeñan papeles cruciales en este sistema. La renina puede activar el angiotensinógeno para convertirlo a angiotensina I, y la ECA es responsable de la transformación de angiotensinógeno I al vasoconstrictor angiotensina II, resultando en la reducción de la habilidad de expansión de los vasos sanguíneos (Aleman *et al.*, 2011). Al ser este sistema un importante regulador de la presión arterial, los medicamentos que inhiben el RAS, ya sea inhibiendo la ECA o bloqueando los receptores de angiotensina, se usan ampliamente en el tratamiento de la hipertensión, sin embargo, éstos llegan a causar efectos secundarios (Arshad *et al.*, 2019). Además del tratamiento

contribuyen a la composición y actividad funcional de los péptidos bioactivos (Merz *et al.*, 2015). Diversos estudios han conducido a investigar las propiedades antihipertensivas de hidrolizados proteicos derivados de fuentes alimenticias, especialmente de fuentes vegetales como soya, nuez, entre otras; así como de proteínas de origen animal por mencionar a la sardina, huevo y salmón (Mine *et al.*, 2010). Por otra parte, cereales como el maíz ha sido estudiado por su gran aporte biológico y genético, por su valor biocultural y por su aporte nutricional y funcional. En este sentido se ha evaluado la presencia de compuestos bioactivos (fitoquímicos) dentro de las ciencias nutragenómicas y nutrigenéticas y se ha relacionado su consumo con la reducción del riesgo de enfermedades crónicas, enfermedades cardiovasculares, obesidad, y con beneficios en la salud del tracto gastrointestinal (Jacinto *et al.*, 2018). De acuerdo con Bello-Pérez *et al.* (2016) los compuestos bioactivos del maíz están presentes en fracciones de salvado, germen y las fracciones del endospermo que contribuyen a la reducción significativa de la presión arterial sistólica y diastólica. Actualmente sigue siendo escasa la información sobre péptidos extraídos de maíces pigmentados criollos originarios de México con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), por lo que la investigación al respecto es necesaria para incentivar el consumo de estos alimentos que coadyuven en la prevención y tratamiento de enfermedades relacionadas con dicha enzima.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El maíz criollo rojo y azul fue cultivado y obtenido de la comunidad de Santa María Tlalmimilolpan, en los parajes denominados Iglesia Vieja, Potrero Grande y San Porfirio, Lerma, Estado de México, cosecha 2018-2019. Los reactivos utilizados en las diferentes determinaciones fueron todos de grado reactivo.

Análisis *in silico*

Se emplearon herramientas bioinformáticas, tales como la base de datos del NCBI para la búsqueda de secuencias primarias de la proteína zeína del maíz, así como en la base de datos UniProtKB- Q41884 en formato Fasta (UniProt Consortium, 2010). Mientras que, el desarrollo de la hidrólisis proteolítica se realizó *in silico*, utilizándose el servidor para predicción de análisis Pepticutter-EXPAS. Esta herramienta se empleó para la simulación de la hidrólisis con el fin de predecir los posibles péptidos de corte enzimático y que son liberados por la enzima

tripsina con la cual se obtuvo el corte de la secuencia de la zeína. Para determinar la probabilidad de encontrar péptidos bioactivos se utilizó el servidor llamado Peptide Ranker, disponible en la siguiente dirección online: <http://bioware.ucd.ie> (Mooney *et al.*, 2012). Además, los péptidos se compararon con la base de datos de las secuencias reportadas en BIOPEP en la siguiente dirección: <http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep> (Minkiewicz *et al.*, 2019).

Proceso de nixtamalización

Para la preparación de la harina se utilizó un proceso tradicional de nixtamalización a través del método descrito por Rodríguez (2013) con algunas modificaciones, como primer paso se pesaron 100 g de maíz posteriormente se cocieron en una solución de hidróxido de calcio al 1 % con relación al peso del maíz. La relación agua:grano fue 3:1 (v/p). El maíz se calentó hasta alcanzar 92 °C por 30-60 minutos. Se dejó reposar durante 16 h para obtener el nixtamal, se lavó dos veces con agua destilada en una relación 2:1 (v/p) para retirar el exceso de cal y finalmente se molió para obtener la masa. La masa se secó y se molió con las mismas características de las harinas procesadas a una temperatura de 70 °C. La harina se molió y tamizó para obtener una partícula más uniforme con un tamiz del # 80 con diámetro de 0.177mm.

Extracción de proteína

La extracción de proteína de las muestras fue realizada por el método descrito por Ramos-Pérez (2012) con modificaciones, donde las muestras de harina sin nixtamalizar maíz azul (MASN) y rojo (MRSN) y nixtamalizadas (MAN y MRN) desengrasadas fueron suspendidas en etanol al 70% en una relación de 1:4 (harina: solvente, p:v) a 60 °C por un tiempo de 2 h con agitación vigorosa. Los concentrados se llevaron a un rotavapor Buchi R-205 para separar la mayor parte del etanol bajo condiciones de temperatura de 40 °C y presión 230 mbar. Las muestras obtenidas se liofilizaron.

Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática se realizó a partir de la metodología descrita por Zhang *et al.* (2009) con algunas modificaciones. Las muestras de proteína liofilizadas provenientes de la harina desengrasada se llevaron bajo condiciones de temperatura de 50 °C, con un pH 7.5 y mediante la adición continua de una solución de NaOH 0.1 N durante 90 minutos tanto para la zeína extraída de maíz azul como del rojo. La enzima que se usó durante la hidrólisis fue tripsina en una relación enzima:sustrato

de 1:25. Al finalizar el proceso de hidrólisis la mezcla se calentó a 85 °C durante 10 minutos para inactivar completamente la enzima.

Actividad antihipertensiva

Se empleó el método reportado por Hayakari *et al.* (1978). El método de evaluación de la actividad antihipertensiva se determinó con una mezcla de amortiguadores de pH de fosfato de potasio 40 mM y cloruro de sodio 300 mM ajustado a un pH de 8.3 con HCl o NaOH 1N y una solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.2 M ajustado a un pH de 8.3. La solución de HHL (hipuril-histidil-leucina) al 0.3%(p/v) se preparó agregando 12 mg en 4 mL de la mezcla de amortiguadores de pH. Además, se preparó una solución estándar de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) U/mL disolviendo la enzima en 1 mL de agua desionizada, de esta solución se tomaron 100 µL y se disolvió en 99 µL de agua desionizada para obtener una solución de 100 mU/mL. Se determinó la actividad biológica de los hidrolizados proteicos de harina desgrasada y liofilizada de maíces azul y rojo criollos bajo condiciones de nixtamalización y sin nixtamalización. La reacción se finalizó con la adición de TT (2, 4,6-tricloro-s-triazina) (6% p/v) en dioxano y la solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.2 M (pH 8.3). Enseguida, la mezcla de reacción se agitó durante 15 segundos y se prosiguió a centrifugar a 10000 g por 10 minutos y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 382 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis in silico

La hidrólisis in silico con tripsina se realizó para predecir la presencia de péptidos bioactivos en la zeína y compararlos con los reportados en la literatura. El Cuadro 1 muestra los sitios de incisión de corte de la enzima.

Cuadro 1. Corte enzimático con tripsina de la secuencia de aminoácidos para la zeína.

Posición del sitio de incisión	Resultados de la secuencia de péptidos	Longitud del péptido (Aminoácidos)	Masa péptica (Da)
4	MAAK	4	419.540
57	FPQYSQAPIA ALLPPYLPSM	53	5754.850
91	LQQAIATSN LPLSPLLQQ SPALSLVQSL	34	3676.310
186	AQQLQQLVL PFSQLATAYS	95	10686.250
240	ASFLTQQQL LPFYQQFSAN	54	6050.012

La hidrólisis con tripsina mostró péptidos que contienen aminoácidos hidrófobos como valina, alanina, prolina, glicina, entre otros, esto coincide con lo reportado por Kongo-Dia-Moukala *et al.* (2011) quienes determinaron que algunos aminoácidos hidrófobos como la glicina, fenilalanina, leucina, alanina, lisina y prolina están predominantemente en el hidrolizado de proteína de maíz desgrasada. Además, Olsen *et al.* (2004) mencionan que los aminoácidos donde realiza la incisión la tripsina incide específicamente en la C-terminal de arginina y lisina teniendo cadenas laterales largas, mientras que Gobbetti *et al.* (1997) reportó un péptido hidrolizado con tripsina con una secuencia de aminoácidos Ser-Ala-Tyr-Pro-Gly-Gln-Ile-Thr-Ser-Asn.

En el caso de la hidrólisis in silico, ésta es determinada por las condiciones de la base de datos, ya que el tamaño de los péptidos se calcula como si toda la enzima elegida estuviera presente durante la digestión. Además, se considera el hecho de que la versión actual del programa Peptide Cutter no tiene en consideración ningún tipo de modificación ni de la secuencia de proteínas ni de las modificaciones provocadas por la escisión.

Después de la hidrólisis in silico, a los péptidos obtenidos se les predijo su posible actividad inhibidora de la ECA y el índice Ranker, éste último para determinar la probabilidad de ser un péptido bioactivo (valores >0.5).

Los valores del índice Ranker muestran que los péptidos LPLSPLLQQ (0.779) y ALLPPYLPSM (0.545) tienen la tasa de probabilidad de predicción más alta, así que en cuanto más cercana sea la probabilidad predicha a 1 más probable es que el péptido presente la actividad de inhibición antihipertensiva. Estos péptidos están ubicados en la posición de incisión 91 y 53 de la secuencia de la zeína.

Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) (Cuadro 2) que se obtuvo para los hidrolizados fue de 13.24% para el testigo (zeína comercial), MRSN 10.38%, MASN 13.96 %, MAN 10.52% y para MRN fue de 8.96%. Mostrando que el GH fue mayor en el maíz azul (sin y con nixtamalización) respecto al maíz rojo.

Con respecto a la literatura los valores obtenidos en este estudio son

mayores, ya que de acuerdo con Casella y Whitaker (1990) la zeína hidrolizada con tripsina mostró un GH de 1.42%, 1.70% y 1.87% de hidrolizados que contenían 3 a 4 polipéptidos, mientras que Kongo-Dia-Moukala et al. (2011) reportaron que para hidrolizados de la harina desgrasada de maíz con la tripsina mostró un porcentaje de GH de 5.45 ± 0.35 . De acuerdo con Mannheim y Cheryan (1993), la hidrólisis de la zeína es posible bajo las condiciones apropiadas, es decir depende de la concentración de enzima, sustrato, tiempo de reacción y uso de una solución orgánica y/o acuosa que mejoren sus propiedades funcionales como la solubilidad.

Actividad inhibitoria de la ECA

La Figura 1 muestra los resultados de la actividad inhibitoria de la ECA. La Figura 1a muestra los valores de muestras sin nixtamalización, en ella se observa que la hidrólisis reduce la actividad de los péptidos del maíz rojo, mientras que, en el caso del hidrolizado de maíz azul este valor se incrementa. Al respecto, el decremento o aumento en la actividad puede deberse a la naturaleza de los péptidos obtenidos de la hidrólisis, por tanto, se requiere la caracterización de los fragmentos peptídicos. Por otra parte, la Figura 1b muestra la actividad de muestras nixtamalizadas, donde en el caso de la proteína de maíz rojo y azul sin hidrolizar los valores de inhibición son ligeramente mayores comparados con los de la Figura 1a, mientras que en el caso de los hidrolizados nixtamalizados sus valores disminuyen por el efecto de este proceso.

Muestra	Proceso de tratamiento	
	Sin Nixtamalizar (%)	Nixtamalización (%)
Testigo (zeína)	13.24 ± 0.52	N ^f
Maíz Rojo	10.38 ± 0.79	8.96 ± 0.01
Maíz Azul	13.96 ± 0.02	10.52 ± 0.57

N^f: No realizado para la prueba nixtamalizada.

Quintanar-Guzmán et al. (2009) mencionan que durante la nixtamalización ocurren diversos cambios estructurales como cambios en la solubilidad y el peso molecular de las proteínas presentes en el grano, modificación de su estructura

secundaria a primaria, que podría estar asociado a la desnaturalización de la proteína nativa como efecto del tratamiento con hidróxido de calcio. Esto supone que la nixtamalización contribuyó a que el proceso de hidrólisis enzimática y la inhibición de la ECA fuera mucho menor con respecto a las muestras de maíz azul y rojo sin nixtamalizar.

Con respecto a la inhibición de la ECA, de acuerdo con Yang et al. (2007) reportaron que para diferentes enzimas utilizadas en la hidrólisis de zeína, el porcentaje de inhibición de la ECA a una concentración de 10 mg/mL, pH 8.0 y una temperatura de 60 °C por 5 h fue: con protamex una inhibición de la ECA de 13.94% y GH: 0.85%; neutrasa, ECA: 47.3%, GH: 2.48%; alcalasa, ECA: 85.26%, GH: 16.96%; y tripsina: 72.80%, GH: 8.97%; por lo anterior, podemos elucidar que tanto tripsina como alcalasa son favorables para obtener péptidos antihipertensivos. Por otro lado, en un estudio realizado por Gobbetti et al. (1997) reportaron que la inhibición de la ECA de muestra de zeína comercial fue mayor a 85% con la enzima tripsina, aislando un decapeptido: SAYPGQITSN con un IC₅₀ de 7.0 μM bajo una concentración de 4 mg/mL. Es probable que la diferencia entre los valores obtenidos y los valores reportados se deben a que en este trabajo se utilizó proteína extraída mientras que en los reportados

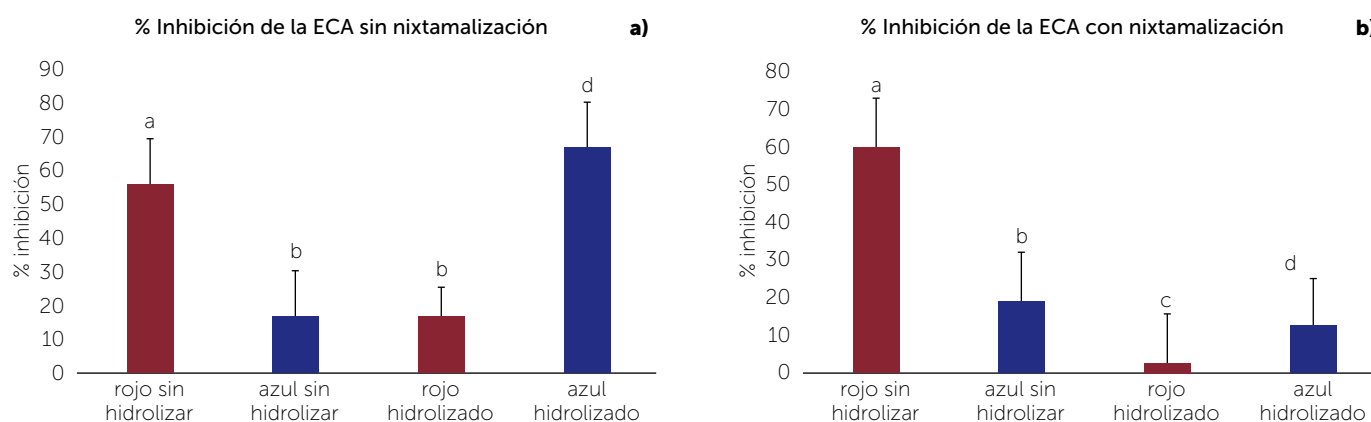


Figura 1. Actividad inhibitoria de la ECA de los hidrolizados proteicos. a) Muestras sin nixtamalizar. b) Muestras nixtamalizadas. Letras distintas indican diferencia estadística significativa (Tukey, $p \leq 0.05$).

se usa normalmente zeína comercial; sin embargo, se requiere la completa caracterización del extracto para concluir al respecto.

CONCLUSIONES

La actividad antihipertensiva *in vitro* del maíz azul sin hidrolizar mostró un menor porcentaje de inhibición de la ECA con respecto al maíz rojo sin hidrolizar. La hidrólisis con tripsina solo incrementa la actividad inhibitoria de la ECA en maíz azul a concentración de 0.3 mg/mL sin nixtamalizar. La nixtamalización incrementa ligeramente la actividad inhibitoria de la ECA en maíces criollos rojo y azul sin hidrolizar. A partir de los datos obtenidos de la inhibición de la ECA, el maíz pigmentado azul criollo sin nixtamalizar podría ser considerado como un alimento funcional para la industria alimentaria ya sea mediante su consumo directo o en el desarrollo de nutraceuticos aprovechando sus propiedades bioactivas. Este valor agregado de sus propiedades en beneficio para la salud de la sociedad mexicana puede ser aprovechado en un futuro en tratamientos para personas con hipertensión arterial.

LITERATURA CITADA

- Achelrod, D., Wenzel, U., & Frey, S. (2015). Systematic review and meta-Analysis of the prevalence of resistant Hypertension in treated hypertensive populations. *American Journal of Hypertension*, 28(3), 355-361. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpu151>
- Alemán, A., Giménez, B., Pérez-Santín, E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2011). Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. *Food Chemistry*, 125(2), 334-341. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.058>
- Arshad, N., Siow, H.-L., Ngoh, Y.-Y., Sofian, N. A. H. S., & Gan, C.-Y. (2019). Enzyme and Bioactive Peptides. A strategy for discovery and identification of antihypertensive peptides. In *Enzymes in Food Biotechnology* (pp. 343-367). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813280-7.00020-7>
- Bello-Pérez, L., G. C.-M. (2016). Nutraceutic aspects of pigmented maize: digestibility of carbohydrates and anthocyanins. *lpn. Elsevierpure.Com*.
- Casella, M. L. A., & Whitaker, J. R. (1990). Enzymatically and chemically modified zein for improvement of functional properties. *Journal of Food Biochemistry*, 14(6), 453-475.
- Fields, K., Falla, T. J., Rodan, K., & Bush, L. (2009). Bioactive peptides: signaling the future. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 8(1), 8-13. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2009.00416.x>
- Gobbetti, M., Smacchi, E., Corsetti, A., Belluccf, M. (1997). Inhibition of proteolytic enzymes from *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and angiotensin I-converting enzyme by peptides from zein, hordein, and gluten hydrolysates. *Journal of Food Protection*, 60(5), 499-504. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.5.499>
- Hayakari, M., Kondo, Y., & Izumi, H. (1978). A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Analytical Biochemistry*, 84(2), 361-369. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90053-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90053-2)
- Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., & Ángel Gómez-Ruiz, J. (2011). Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. *Small Ruminant Research*, 101, 196-204. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.09.040>
- Jacinto, B., Cecilia, G., ... C. R.-C. P. (2018). The maize contribution in the human Health. *Books.Google.Com*.
- Kongo-Dia-Moukala, J.U., Atindana-Nsor, J. and Zhang, H. (2011). Hypocholesterolemic activity and characterization of protein hydrolysates from defatted corn protein, *Asian. Journal of Biochemistry*, 6(6), 439-449. <https://doi.org/10.3923/ajb.2011.439.449>
- Kongo-Dia-Moukala, J. U., Zhang, H., & Claver Irakoze, P. (2011). In vitro binding capacity of bile acids by Defatted corn protein hydrolysate. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(2), 1066-1080. <https://doi.org/10.3390/ijms12021066>.
- Krousel-Wood, M., Thomas, S., Muntner, P., & Morisky, D. (2004). Medication adherence: a key factor in achieving blood pressure control and good clinical outcomes in hypertensive patients. *Current Opinion in Cardiology*, 19(4), 357-362. <https://doi.org/10.1097/01.hco.0000126978.03828.9e>
- Malaguti, M., Dinelli, G., Leoncini, E., Bregola, V., Bosi, S., Cicero, A., & Hrelia, S. (2014). Bioactive peptides in cereals and legumes: Agronomical, biochemical and clinical aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), 21120-21135. <https://doi.org/10.3390/ijms151121120>
- Mannheim, A., & Cheryan, M. (1993). Water-soluble zein by enzymatic modification in organic solvents.
- Merz, M., Eisele, T., Claaßen, W., Appel, D., Rabe, S., Stressler, T., & Fischer, L. (2015). Continuous long-term hydrolysis of wheat gluten using a principally food-grade enzyme membrane reactor system. *Biochemical Engineering Journal*, 99, 114-123. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.03.019>
- Mine, Y., Li-Chan, E., & Jiang, B. (2010). Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals. In Y. Mine, E. Li-Chan, & B. Jiang (Eds.), *Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals*. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780813811048>.
- Minkiewicz, P., Iwaniak, A., & Darewicz, M. (2019). BIOPEP-UWM Database of bioactive peptides: current opportunities. *Mdpi. Com*. <https://doi.org/10.3390/ijms20235978>
- Mooney, C., Haslam, N., Pollastri, G., one, D. S.-P. (2012). Towards the improved discovery and design of functional peptides: common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity.
- Olsen, J. V., Ong, S. E., & Mann, M. (2004). Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Molecular and Cellular Proteomics*, 3(6), 608-614. <https://doi.org/10.1074/mcp.T400003-MCP200>
- Quintanar-Guzmán, A., Jaramillo-Flores, M. E., Mora-Escobedo, R., Chel-Guerrero, L., & Solorza-Feria, J. (2009). Changes on the structure, consistency, physicochemical and viscoelastic properties of corn (*Zea mays* sp.) under different nixtamalization conditions. *Carbohydrate Polymers*, 78, 908-916. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.024>

- Ramos Pérez, I. E. (2012). Estudio de la actividad hipolipemiente de zeinas extraídas de maíz blanco y negro nixtamalizado y sin nixtamalizar, empleando ratones con hipercolesterolemia. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional.
- Rodríguez, L. (2013). Evaluación de propiedades fisicoquímicas y nutraceuticas de harina y tortilla elaboradas con un proceso de nixtamalización ecológica. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro.
- Saleh, A. S. M., Zhang, Q., & Shen, Q. (2016). Recent research in antihypertensive activity of food protein-derived hydrolyzates and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(5), 760-787. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.724478>
- Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. In *Food Quality and Safety* (Vol. 1, Issue 1, pp. 29–46). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx006>
- The UniProt Consortium, The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010, *Nucleic Acids Research*, Volume 38, Issue suppl_1, 1 January 2010, 142–148, <https://doi.org/10.1093/nar/gkp846>
- Yang, Y., Guanjun, T. A. O., Ping, L. I. U., & Liu, J. I. A. (2007). Peptide with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity from hydrolyzed corn gluten meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 789-7895. <https://doi.org/10.1021/jf0705670>
- Zhang, J., Zhang, H., Wang, L., Guo, X., Wang, X., & Yao, H. (2009). Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysate: Identification of the active peptide. *European Food Research and Technology*, 229(4), 709-719.

