

Digestión in vitro de proteínas de origen animal y su efecto sobre la producción de péptidos con actividad inhibidora de la ECA

Luis Ojeda-Ojeda¹, Valentina Rivera², Anira Valero³, José López⁴, Héctor Quintero⁵, Nirza Noguera-Machado⁶

RESUMEN

Antecedentes: Los huevos son unos de los alimentos más consumidos en el mundo por su alto contenido de nutrientes. Sin embargo, los péptidos producto de su digestión inhiben a la Enzima Convertidora de la Angiotensina (ECA) que es la responsable de regular la presión sanguínea. **Objetivo:** en función de la relación que existe entre los huevos y la salud, se propuso en este estudio evaluar cómo afecta el proceso gastrointestinal *in vitro*, la producción de péptidos bioactivos de diferentes albuminas la actividad de la ECA. **Materiales y Métodos:** se evaluaron, huevo de gallina de granja industrializada, huevo de avestruz, huevo de codorniz, huevo de gallina criolla y como control se usó lactosuero. Se usó el Hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL) como sustrato de ECA y se determinó la inhibición en función de la producción de ácido hipúrico **Resultados:** Los péptidos de los huevos gallina de granja y el lactosuero mostraron los valores más altos de actividad inhibitoria 94,01% y 91,02% respectivamente, mientras que las de gallinas criollas reportaron 82,63%. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre ellos. La fracción de péptidos de los huevos de avestruz presentó un 65,86% y codorniz 3,19%. **Conclusiones:** con excepción de los huevos de codorniz, todas las fracciones proteicas mostraron ser buenas productoras de péptidos bioactivos.

Palabras clave: inhibición ECA, *Struthio camelus*, *Coturnix coturnix*, *Gallus gallus domesticus*, péptidos bioactivos

^{1*} Autor de correspondencia. PhD, Universidad de Carabobo, Sección de Biotecnología-Agroindustrial del Instituto de Investigaciones Biomédicas Dr. "Francisco Javier Triana Alonso" Maracay-Venezuela. lojeda2@uc.edu.ve, ORCID: 0000-0002-1004-9313

² MC, Escuela de Medicina, Universidad de Carabobo, Maracay-Venezuela. valentinah50@gmail.com, ORCID: 0000-0002-8321-8843

³ MC, Escuela de Medicina, Universidad de Carabobo, Maracay-Venezuela. anivh258@gmail.com, ORCID: 0009-0004-6877-0500

⁴ MC, Escuela de Medicina, Universidad de Carabobo, Maracay-Venezuela. josedaniellss2@gmail.com, ORCID: 0000-0003-1070-2594

⁵ MC, Escuela de Medicina, Universidad de Carabobo, Maracay-Venezuela. hectorquinterop@gmail.com, ORCID: 0000-0003-1725-5782

⁶ PhD, Universidad de Carabobo, Sección de Biotecnología-Agroindustrial del Instituto de Investigaciones Biomédicas Dr. "Francisco Javier Triana Alonso" Maracay-Venezuela, nnoguera1@uc.edu.ve, ORCID: 0000-0002-0811-9124

Animal origin protein in vitro digestion and its effect on the production of peptides with ACE inhibitory activity

ABSTRAC

Background: Eggs are one of the most consumed foods in the world because of their high nutrient content. However, the peptides produced by their digestion inhibit ACE, which is responsible for regulating blood pressure. **Objective:** in view of the relationship between eggs and health, we proposed in this study to evaluate how the *in vitro* gastrointestinal process and the production of bioactive peptides from different ovalbumins affect ACE activity. **Materials and Methods:** industrialized farm chicken egg, ostrich egg, quail egg, creole chicken egg and whey was used as control. The Hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL) was used as an ECA substrate and inhibition was determined as a function of hippuric acid production **Results:** Peptides from free-range chicken eggs and whey showed the highest values of inhibitory activity. 94.01% and 91.02% respectively, while eggs from Creole hens reported 82.63%. However, there were no significant differences between them. The peptide fraction of ostrich eggs 65.86% and quail 3.19%. **Conclusions:** With the exception of quail eggs, all protein fractions were shown to be good producers of bioactive peptides.

Keywords: ACE inhibition, *Struthio camelus*, *Coturnix coturnix*, *Gallus gallus domesticus*, whey, bioactive peptides.

INTRODUCCIÓN

Los huevos de gallina (*Gallus gallus domesticus*) son unos de los alimentos más consumidos en el mundo por su alto contenido de nutrientes. Numerosos estudios han demostrado que la proteína del huevo es altamente digerible, una excelente fuente de aminoácidos esenciales y combustible indiscutible del músculo esquelético (1). Adicional a las proteínas de alta digestibilidad y calidad, también aportan colina, folato, vitamina D, yodo y vitaminas del grupo B (2).

Adicional al aporte nutricional de los huevos, muchos reportes presentes en la literatura científica afirman que la albumina del huevo de gallina es la fuente más rica en péptidos bioactivos entre todos los alimentos (3). Uno de los primeros en observar ese efecto fue Aleixandre et al. (2008), quienes encontraron que algunos fragmentos de proteínas alimentarias, una vez liberados mediante hidrólisis, podían producir un descenso del tono arterial (4). La enzima que se ve afectada en este proceso es la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

A nivel fisiológico, el sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) es el encargado del mantenimiento de la homeostasis del medio interno y de la presión arterial (5). El incremento de la presión arterial ocurre en forma de cascada proteolítica conectada a un sistema de transducción de señales, en el cual la renina es secretada y almacenada en el aparato yuxtglomerular, situado en la arteriola aferente del glomérulo renal (5); posteriormente cataliza el angiotensinógeno, sintetizado a nivel del hígado, en angiotensina I (decapéptido inactivo), para luego ser catalizado por la ECA, a angiotensina II (octapéptido biológicamente activo) que actúa como un potente vasoconstrictor (6,7).

En vista de que en la gastronomía global se consumen huevos de diferentes aves los péptidos con capacidad inhibitoria de la ECA (producto de la hidrólisis de la albumina) son de gran interés en el área de nutrición, por su posible uso como alternativa para regular la presión sanguínea, se propuso en este estudio evaluar cómo afecta el proceso gastrointestinal (mediante un ensayo *in vitro*) la producción de péptidos bioactivos con actividad inhibitoria de la enzima de diferentes albuminas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales biológicos

Proteínas de origen animal

Huevo de gallina de granja industrializada (*Gallus gallus domesticus*, raza Leghorn var blanca), huevo de avestruz (*Struthio camelus*), huevo de codorniz común (*Coturnix coturnix*), huevo de gallina criolla (*Gallus gallus domesticus*, raza New Hampshire) y lactosuero (subproducto de la industria láctea). Todos fueron adquiridos en la ciudad de Maracay (Venezuela). La enzima (ECA) se extrajo a partir de pulmón de *Oryctolagus cuniculus*, el cual fue obtenido en un supermercado de la ciudad de Maracay (Venezuela).

Materiales químicos grado analítico

Para las pruebas de actividad biológica se trabajó con compuestos químicos de grado analítico, producido por casas comerciales. Como sustrato de la ECA, se empleó el Hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL) Sigma-Aldrich (207386-83-2). Se trabajó para la digestión enzimática de las proteínas con la pepsina Sigma-Aldrich de origen porcino (9001-75-6) y la pancreatina Sigma-Aldrich de origen porcino (8049-47-6).

Obtención del extracto de ECA

Para la obtención del extracto enzimático de ECA se usó el método descrito por Makoto et al. (8) con las modificaciones propuestas por Ojeda et al. (9). El tejido de pulmón de conejo fue lavado con buffer fosfato de potasio de 10 mM a pH 8,3 (frio), fue cortado en trozos y sometido a homogenización usando un disruptor de cuchilla (licuadora). La mezcla homogeneizada se centrifugó a 5000 g x 10 min en una centrifuga (Becton Dickinson, MD 21152) y el sobrenadante fue sometido a diálisis (membrana de corte 3000 kDa) por 24 horas usando el mismo tampón a 4°C. El dializado obtenido se usó como fuente de la ECA para los ensayos.

Aislamiento de las albúminas

Los huevos fueron cuidadosamente lavados con agua y jabón para eliminar cualquier resto de contaminante que estuviera presente en la cáscara. Posteriormente se procedió hacer un pequeño corte en la cáscara en ambiente de campana usando un bisturí estéril, seguido le fueron sustraídos 1mL de albúmina y colocado en un envase de crioconservación de 2 mL a -4°C hasta su posterior uso. Este procedimiento se usó para cada especie.

Digestión gastrointestinal *in vitro*

Las muestras fueron sometidas al método de hidrolizado secuencial pepsina-pancreatina descrito por Li et al. (10) con modificaciones. Se tomó un volumen de albúmina y se sometió a una hidrólisis enzimática a pH ácido, con una solución de pepsina (0,5 mg/mL) y HCl 0,1 N hasta alcanzar un pH de 2, la mezcla ([E/S] :1/50) fue incubada a 37°C por 2 h en una incubadora de agitación orbital (Jisico, J-NS10). Cumplido el tiempo la mezcla fue neutralizada con una solución de NaOH 1M hasta alcanzar un pH de 8. Seguido se le agregó un volumen de pancreatina de 0,5 mg/mL hasta alcanzar una proporción de [E/S] :1/50, para luego ser incubado a 37°C por 2h en una incubadora con agitación orbital. La hidrólisis fue detenida inactivando la proteasa por calentamiento a 85°C por 20 min. Los hidrolizados se centrifugaron a 12000 x g durante 45 min a 4°C y los sobrenadantes se congelaron a -4°C hasta su análisis.

Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas de los hidrolizados proteicos obtenido de la digestión pepsina-pancreatina, fueron cuantificadas por el método de Hartree-Lowry. Un volumen del sobrenadante se combinó con un volumen del reactivo A (hidróxido de sodio 0,5 N, carbonato de sodio anhidro 10%, tartrato de sodio y potasio

tetrahidratado 0,2%), seguido fue incubado 50°C/10 min, luego se le adicionó el reactivo B (hidróxido de sodio 0,1 N, sulfato de cobre pentahidratado 1% y tartrato de sodio y potasio tetrahidratado 2%). La reacción se detuvo con la adición del reactivo C (reactivo del fenol según Folin-Ciocalteu: Agua 2:15 v/v). Las absorbancias fueron determinadas en un espectrofotómetro (Beckman DU) a 650 nm (11) La curva de calibración se obtuvo mediante la determinación de la absorbancia de diferentes concentraciones de BSA (entre 1 y 50 mg/mL), los valores obtenidos fueron sometidos a un proceso de regresión lineal, para obtener la ecuación de la recta ($R^2=0,998$) y a partir de esta se transformaron las absorbancias en concentración.

Determinación de la actividad inhibitoria sobre ECA

Se empleó la metodología propuesta por Cú-Cañetas et al. (12), con modificaciones. Se mezcló 10 µL del extracto de la ECA, 40 µL de HHL (1mg/mL) y 10 µL del sobrenadante de la digestión a una concentración de 1mg/mL, para luego ser incubados a 37°C/30 min. La reacción se detuvo adicionando 50 µL HCl 2N, obteniendo como productos L-leucina-L-histidina y ácido hipúrico. La concentración de ácido hipúrico se determinó usando la metodología de Brizuela y Jiménez (13), mediante espectrofotometría de absorción visible, Método 8300 (NIOSH, 1994).

Para obtener el porcentaje de inhibición de cada una de las muestras se utilizó lo establecido por Asoodeh et al. (14).

$$\% \text{ Inhibición de ECA} = \frac{[(\text{CAH Control} - \text{CAH inhibidor}) / \text{CAH Control}] \times 100}{100}$$

Donde:

CAH: es la concentración de ácido hipúrico cuantificada en cada ensayo.

Análisis Estadístico

Los valores de concentración de ácido hipúrico fueron agrupados y sometidos a pruebas de media y desviación estándar. Se condujo un ensayo con 5 tratamientos y tres repeticiones bajo un diseño completamente aleatorizado, los tratamientos consistieron en la albumina de las diferentes aves y el lactosuero como control positivo, para medir porcentaje de inhibición de ECA. Se verificó el cumplimiento de los supuestos homogeneidad de varianzas con la prueba de Bartlett y normalidad de los residuales con la prueba de Ryan-Joyner, y se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía para verificar si hay diferencias entre los tratamientos, además, las comparaciones de medias se realizaron con la prueba de comparaciones múltiples de la diferencia honestamente significativa de Tukey. El nivel de significación se fijó en 5%, por lo cual un resultado se consideró estadísticamente significativo si $p \leq 0,05$. Los datos se procesaron con el programa estadístico Minitab 18.0 para Windows.

RESULTADOS

Inicialmente los resultados fueron agrupados para un breve análisis descriptivo donde se determinó la media y la desviación estándar de cada tratamiento. Los resultados del efecto inhibitorio de péptidos bioactivos encontrados en el ensayo se presentan a continuación en la siguiente figura.

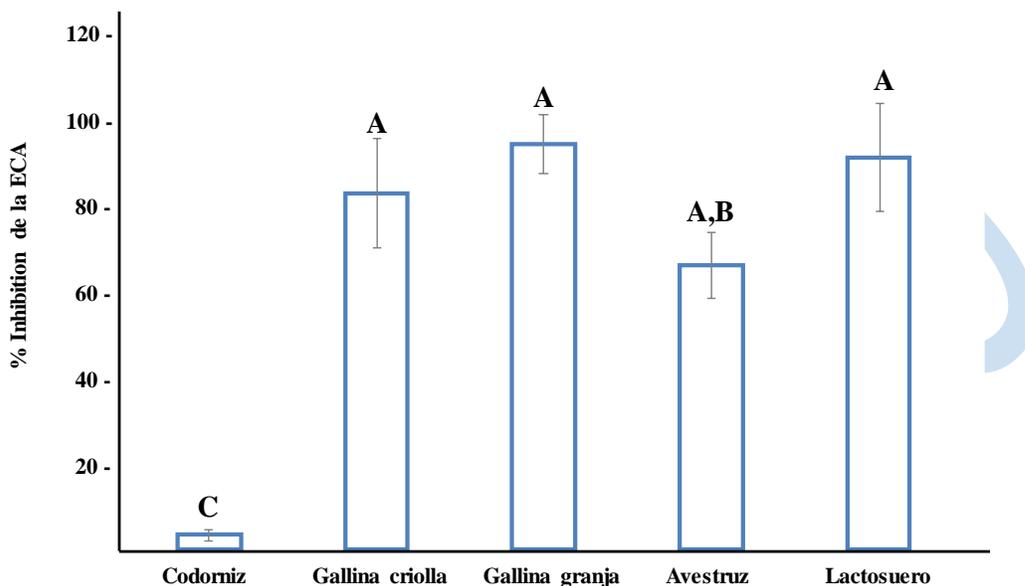


Figura 1. Efecto inhibitorio de los diferentes tratamientos evaluados sobre la actividad de la ECA. Las letras representan los grupos categorizados según la prueba de medias. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas al 5% entre los grupos.

Como se puede observar en la figura 1, el mayor porcentaje de inhibición lo obtuvieron los péptidos solubles derivados de la albúmina de huevos de gallina de granja ($94,01 \pm 6,78\%$), seguido por el lactosuero ($91,02 \pm 12,70\%$), en orden decreciente se observa la albúmina de huevos de gallina criolla ($82,63 \pm 12,70\%$). Estos dos últimos mostraron valores altos de desviación. Entre los resultados interesantes destacan el del huevo de avestruz ($65,87 \pm 7,62\%$), mientras que la albúmina del huevo de codorniz presentó un bajo efecto inhibitorio en el presente ensayo ($3,19 \pm 1,10\%$).

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), para conocer si había diferencias significativas entre el efecto inhibitorio de los diferentes sustratos estudiados. La prueba de Bartlett para homogeneidad de las varianzas indicó que las varianzas de los tratamientos son estadísticamente iguales ($B=4,77$; $p=0,989$), y la prueba de normalidad de Ryan-Joyner indicó que los residuales se distribuyen normalmente ($RJ=0,981$; $p>0,100$), por lo cual puede aplicarse el ANOVA de una vía. El análisis mostró que hay diferencias estadísticamente significativas para el porcentaje de inhibición de ECA entre los tratamientos considerados ($p<0,001$), por lo cual el porcentaje de inhibición es dependiente de éstos, en ese sentido, la prueba de comparaciones múltiples de Tukey formó 5 grupos de medias homogéneas, el grupo A, formado por los tratamientos gallina criolla, gallina de granja y lactosuero, los cuales presentaron los mayores

porcentajes de inhibición de ECA; seguido por el grupo de transición AB, formado por el tratamientos avestruz y finalmente, el grupo C que presentó los menores porcentajes de inhibición formado por codorniz.

DISCUSIÓN

Uno de los aspectos de innovación del trabajo fue el uso del lactosuero como control positivo en lugar del Captopril, que es el más usado para este tipo de estudio, debido a que es un subproducto de la industria láctea, rico en péptidos bioactivos ampliamente reportado en la literatura científica. Ese potencial nutracéutico como inhibidor de la ECA ha sido reportado en numerosos estudios *in vitro* como *in vivo* por su capacidad de disminuir las cifras tensionales de la presión arterial sistólica y de la presión arterial diastólica en pacientes hipertensos sin medicar (15).

En lo que respecta a la diferencia inhibitoria entre las albuminas de las dos razas de gallina (figura 1) puede estar asociado con la nutrición que recibe de cada especie, ya que las gallinas de granja reciben alimentos balanceado con proporción adecuada de proteínas, carbohidratos, grasas y micronutrientes (minerales y vitaminas), mientras que la dieta de la gallina doméstica se basa principalmente en semillas y sobras de los alimentos. Esa potente actividad observada en este estudio coincide con la reportada por Pokora et al. (16), quienes purificaron dos péptidos de la ovoalbúmina de huevos de gallina y obtuvieron un promedio de IC_{50} de 50 μ g y el trabajo de Fan et al. (17), quienes evaluaron péptidos provenientes de la digestión de la clara de huevo de estas aves y encontraron que el valor de $IC_{50} > 20$ μ g y que adicionalmente eran resistentes a la digestión (hallazgo que respaldar aún más su aplicación nutracéutico). Estos autores reportaron concentraciones inhibitorias mucho más baja que la usada en este trabajo, pero se trata de moléculas purificadas por HPLC, mientras que las empleadas en el trabajo no fueron purificadas.

El potencial que tienen los péptidos de la clara de huevo de gallina hay que tenerlo en consideración, ya que en la actualidad muchos nutricionistas recomiendan el consumo de huevos, basándose en que reportes recientes científicos que sugieren que no existen riesgo en el consumo de este alimento al no estar asociado con dislipidemias, ni riesgos de enfermedades cardiovasculares (18,19), pero no se ha evaluado con profundidad el efecto de un alto consumo de este alimento en personas, como por ejemplo los culturistas cuyas dietas incluyen al menos cinco o seis huevos por servicio o personas normo e hipertensas (medicados y no medicados), para saber si ocurren cambios en la salud de los pacientes.

Entre las novedades de este estudio está la evaluación de la clara del huevo del avestruz. Esta ave exótica oriunda de las llanuras africana se está criando en granjas especializadas en muchas regiones del continente americano ya que su carne y sus huevos son cada vez más comercializados, lo que ha aumentado su consumo. Entre las referencias más destacadas está el trabajo hecho por Asoodeh et al. (14), quienes aislaron péptidos de la albumina del huevo de avestruz (HA23) y encontraron un porcentaje inhibitorio de más del 90% para una concentración de

0,15 mg/mL, lo que equivale a 6,6 veces más bajo al usado en el estudio. Posteriormente en 2018 el grupo de Khueychai et al. (20), trabajaron también con huevos de avestruz, obteniendo después de la digestión un péptido (YV). Ellos determinaron el CI_{50} (63,97 $\mu\text{g/mL}$) y determinaron que YV actuaba como un inhibidor competitivo de la ECA con una constante de inhibición (K_i) de 55,20 $\mu\text{g/mL}$. Nuestro resultado es muy prometedor si tomamos en consideración que las muestras de péptidos provenientes de la clara de huevo del avestruz evaluadas en este estudio no fueron purificadas ni concentradas.

El efecto de los péptidos bioactivos de la albumina de los huevos de codorniz sobre la ECA, ha sido poco estudiado por la comunidad académica y no se encontró información en las principales bases de datos científicas que permitan confirmar si este resultado se debe a alguna propiedad fisicoquímica específica de este tipo de albumina. En este sentido, el estudio realizado por Kudre et al. (21) demostró que los huevos de codorniz en polvo tienen propiedades diferentes a los de gallinas en polvo. Por lo que es probable que los péptidos también tengan diferentes propiedades y por ende distinto efecto sobre ECA. Al existir pocos reportes este hallazgo pasa a ser relevante y servirá de precedente a futuros estudios sobre el potencial bioactivo de este tipo de huevos.

Como conclusión se podría mencionar que las albuminas aportan péptidos bioactivos después del proceso digestivo y que estos tienen numerosas funciones metabólicas (algunas reconocidas y otras no). Esta información hay que tener en consideración cuando se recomiendan dietas en las que el consumidor consuma varios huevos a la vez. Es necesario continuar haciendo estudios sobre los efectos del consumo de huevo sobre esta población que es vulnerable.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses para la realización del presente trabajo

FINANCIACIÓN

El trabajo no conto con ningún tipo de financiamiento institucional, todos los gastos fueron sufragados por los autores.

Referencias

1. Puglisi MJ, Fernández ML. The health benefits of egg protein. *Nutrients*. 2022, 14(14), 2904. <https://doi.org/10.3390/nu14142904>.
2. Myers M, Ruxton CH. Eggs: healthy or risky? a review of evidence from high quality studies on hen's eggs. *Nutrients*. 2023, 15(12), 2657. <https://doi.org/10.3390/nu15122657>.
3. Liu YF, Oey I, Bremer P, Carne A, Silcock P. Bioactive peptides derived from egg proteins: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018, 58(15):2508-2530. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1329704>
4. Aleixandre A, Miguel M, Muguerza B. Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de leche y huevo. *Nutr Hosp*. 2008,23(4):313–8. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112008000500002
5. Díaz KM, Murad JE, Acosta BA. Importancia de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en la circulación coronaria. *Arch Cardiol Mex*. 2001 Oct;71(4):12–5. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-99402001000400003
6. Matoba N, Yamada Y, Usui H, Nakagiri R, Yoshikawa M. Designing potent derivatives of ovokinin(2-7), an anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2001, 65(3):736-9. <https://doi.org/doi:10.1271/bbb.65.736>.
7. Liu YF., Oey I, Bremer P, Carne A, Silcock P. Bioactive peptides derived from egg proteins: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018, 58(15), 2508-2530. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1329704>.
8. Makoto H, Yoshikazu K, Hiroshi, I. A Rapid and simple spectrophotometric assay of Angiotensin-Converting Enzyme. *Anal Biochem*. 1978, 84:361–9. <https://doi.org/10.1177/108201320505678>
9. Ojeda-Ojeda L, López JD, Quintero HJ, Rivera V, Valero A, Pérez-Ybarra L, Pacheco F, Díaz J, Noguera-Machado N. Peptide inhibitors of Angiotensin-I converting enzyme (ACE) bioavailability in legumes subjected to hydrothermal treatment. *Indones Food Nutr Progress*. 2024, 1(1);22-29, <https://doi.org/10.22146/ifnp.89554>.
10. Li GH, Le GW, Liu H, Hui Shi, Y. Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Food Sci Tech Inte*. 2005, 11(4), 281-287. <https://doi.org/10.1177/1082013205056781>.
11. Flores L. y Ruiz A. Implementación de una metodología analítica para la cuantificación de proteínas en la microalga *Arthrospira platensis*. *Rev Soc Quím Perú*. 2017, 83(4):371-381. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v83i4.219>

12. Cú-Cañetas T, Betancur D, Gallegos S, Sandoval M, Chel, L. Studies in vitro inhibition of the angiotensin-converting enzyme-I, hypotensive and antihypertensive effects of peptide fractions of *V. unguiculata*. *Nutr Hosp*. 2015, 32(5), 2117-2125. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.5.9624>.
13. Brizuela J, Jiménez Y. Niveles urinarios de fenol y ácido hipúrico en trabajadores de una empresa de pintura automotriz. *Salud Trab*. 2010, 18(2):107-116. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-01382010000200003
14. Asoodeh A, Homayouni-Tabrizi M, Shabestarian H, Emtenani S, Emtenani, S. Biochemical characterization of a novel antioxidant and angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *Struthio camelus* egg white protein hydrolysis. 2016, *J Food Drug Anal*. 24(2):332–42. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.11.010>.
15. Martínez-Maqueda D, Miralles B, Recio I, Hernández-Ledesma, B. Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Food Func*. 2012, 3(4), 350-361. <https://doi.org/10.1039/C2FO10192K>.
16. Pokora M, Zambrowicz A, Dąbrowska A, Eckert E, Setner B, Szotysik M, et al. An attractive way of egg white protein by-product use for producing of novel anti-hypertensive peptides. *Food Chem*. 2014, 15;151:500–5. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.111>
17. Fan H, Wang J, Liao W, Jiang X, Wu J. Identification and characterization of gastrointestinal-resistant angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from egg white proteins. *J Agric Food Chem*. 2019, 67(25), 7147-7156. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01071>
18. Puglisi MJ, Fernandez ML. The health benefits of egg protein. *Nutrients*. 2022, 14, 2904. <https://doi.org/10.3390/nu14142904>.
19. Dehghan M, Mente A, Rangarajan S, Mohan V, Lear S., Swaminathan, S. et al. Association of egg intake with blood lipids, cardiovascular disease, and mortality in 177,000 people in 50 countries. *Am J Clin Nutr*. 2020, 111(4), 795-803. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz348.20>.
20. Khueychai S, Jangpromma N, Choowongkomon K, Joompang A, Daduang S, Vesaratchavest, M, et al. A novel ACE inhibitory peptide derived from alkaline hydrolysis of ostrich (*Struthio camelus*) egg white ovalbumin. *Process Biochem*. 2018, 73, 235-245. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.014>.
21. Kudre TG, Bejjanki SK, Kanwate BW, Sakhare PZ. Comparative study on physicochemical and functional properties of egg powders from Japanese quail and white Leghorn chicken. *Inte J Food Prop*. 2018 21(1), 957–972. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1466320>