

Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos

Carlos Alvarado Carrasco ¹, Marisa Guerra ²

Resumen. El lactosuero derivado de la elaboración de quesos casi siempre ha sido considerado como un desecho con poco valor comercial. Su destino sigue siendo uno de los problemas más serios que enfrenta la industria láctea a nivel mundial. En el mercado existen productos que incluyen al lactosuero como ingrediente, principalmente como medio para aumentar los sólidos lácteos a un bajo costo y, en menor grado, para aprovechar algunas de sus propiedades funcionales de las proteínas del suero, tales como, formación de espuma, retención de agua libre y espesante. Debido a una continua actividad de investigación, se está logrando incrementar el número de aplicaciones funcionales (como fuente de péptidos con actividad biológica: hipotensivos, antioxidantes, antitrombóticos e inmunomoduladores, entre otros) y nutricionales (como fuente de energía, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales), promoviendo así el empleo del lactosuero como ingrediente y como alimento funcional. En los últimos años, relativamente pocos estudios han reportado el papel que juegan algunas fracciones peptídicas del lactosuero sobre la salud de los consumidores, en comparación con las derivadas de las caseínas, que han recibido mayor atención. En la presente revisión se recopiló información, sobre las investigaciones realizadas para el aprovechamiento de la fracción proteica del lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *An Venez Nutr* 2010;23 (1): 42-49.

Palabras clave: Lactosuero, péptidos bioactivos, proteínas del suero.

Whey as a source of bioactive peptides

Abstract. Whey derived from cheese making operations has always been regarded as a low value waste. It's destination is still one of the most serious problems faced by the dairy industry worldwide. Some food products in the market include whey as an ingredient, mainly as a way to increase dairy solids at a low cost, and to a lesser degree, to take advantage of its functional properties, such as foaming, water retention and thickening agent. Thanks to a continuous research activity, there has been an increase in the number of functional (as a source of peptides with biological activity: hypotensives, antioxidants, antithrombotics or immunomodulators, among others) and nutritional applications (as a source of energy, essential amino acids, vitamins and minerals), promoting the use of whey as an ingredient and a functional food. Recently, relatively few studies have reported the role that some whey peptide fractions play over the consumer's health, in comparison with those derived from caseins. This review compiles information, regarding research done on whey as a source of bioactive peptides. *An Venez Nutr* 2010;23 (1): 42-49.

Key words: Whey, bioactive peptides, whey proteins.

Introducción

La leche, y los productos lácteos en general, son fuentes importantes de nutrientes en la dieta humana suministrando energía, proteínas de alta calidad, vitaminas esenciales y minerales. En los últimos años, un creciente reconocimiento de que los alimentos contienen componentes que pueden afectar la salud, ha motivado a muchos científicos a buscar clarificar el papel de los componentes alimenticios en el mantenimiento de la salud y prevención de enfermedades. En este sentido, se han reportado las propiedades bioactivas de un número importante de componentes de la leche, demostrándose

que ella contiene proteínas específicas, péptidos y ácidos grasos que poseen actividad biológicas (1).

Péptidos bioactivos han sido definidos como fragmentos específicos de proteínas, de origen animal o vegetal, que tienen un impacto positivo sobre funciones o condiciones corporales y que pueden definitivamente influir sobre la salud humana, más allá de una nutrición normal y adecuada. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos en el péptido, su administración oral podría afectar alguno de los principales sistemas del organismo: cardiovascular, nervioso, gastrointestinal e inmune (2,3). Es decir, que la actividad biológica está relacionada con la composición y secuencia de los aminoácidos que los conforman (4). Según un reporte de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos, la investigación sobre componentes bioactivos de origen alimentario constituye un área focal clave en la investigación futura para mejorar la salud humana a través de la nutrición (1). Esto se ve reforzado por lo señalado por autores como Haque y Chand (5) sobre la creciente preocupación, por parte de los consumidores, con respecto a los efectos negativos de algunos

1. M.Sc. en Ciencia de los Alimentos, Universidad Simón Bolívar (USB). Profesor Agregado, Cátedra de Industria de la Leche y de la Carne, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela (UCV).

2. Doctor en Ciencia de los Alimentos, Universidad de Campinas, Brasil. Profesor Titular, Departamento de Procesos Biológicos y Bioquímicos, USB.

Solicitar copia a: alvarado1959@yahoo.com

ingredientes químicos sintéticos y el aumento en la preferencia por compuestos “naturales”.

La mayoría de los péptidos bioactivos descritos hasta el presente tienen propiedades estructurales en común, tales como, cadena corta de aminoácidos (de 2 a 9 aminoácidos), residuos aminoácidos hidrofóbicos en adición a grupos prolina, lisina o arginina, y resistencia a la acción de peptidasas digestivas (6). Esto último permite su absorción y paso al torrente sanguíneo, sin alteración.

La variedad de compuestos nitrogenados (proteínas y péptidos) presentes en el lactosuero, exhiben un rango de actividades biológicas que afectan procesos como la digestión, las respuestas metabólicas a los nutrientes absorbidos, el crecimiento y desarrollo de órganos específicos, y la resistencia a enfermedades. Los estudios sobre la actividad biológica de las proteínas de la leche han sido recopilados en diversas revisiones, tal como la presentada por Madureira et al (7). Estas proteínas contienen dentro de su secuencia de aminoácidos, precursores de péptidos bioactivos que pueden ser liberados por reacciones hidrolíticas. Estos péptidos influyen directamente numerosos procesos biológicos que provocan diversas respuestas humorales, gastrointestinales, hormonales, inmunológicas, neurológicas y nutricionales (8).

La mayoría de estos péptidos han sido obtenidos a partir de las caseínas y muy pocos a partir de las proteínas del lactosuero descartado por la industria del queso. El presente trabajo tiene como objetivo resumir toda la información relevante existente sobre el tema, a partir del cual se pueda generar un mayor número de investigaciones en el corto plazo. Se espera de esta forma contribuir con el aprovechamiento de este valioso subproducto lácteo.

Métodos

La recopilación de artículos necesarios para alcanzar el objetivo planteado, se realizó a través del motor de búsqueda de ScienceDirect, descargándose los archivos correspondientes en formato pdf.

Lactosuero

El lactosuero es el subproducto resultante de la separación de la caseína precipitada durante la elaboración de quesos, históricamente considerado un producto de desecho, descartado de la forma más económica posible o procesado como producto de relativo bajo valor, como suero en polvo o en los distintos grados de concentrado o aislado de proteínas del lactosuero (WPC, WPI) (9). Es un líquido de color amarillo-verdoso cuya composición físico-química variará dependiendo del método de fabricación empleado, tipo de leche (bovina, caprina, ovina, etc.),

época del año, tipo de alimentación del rebaño y etapa de la lactación promedio (10,7). Considerando que a partir de la coagulación enzimática de 100 Lts de leche, se pueden obtener de 9 a 30 kg de cuajada, dependiendo de la especie y raza del rebaño lechero, se tiene que el suero resultante constituirá entre 70% y 90% del volumen total de la leche empleada inicialmente en la elaboración de los quesos, y en él se retendrá alrededor del 55% de los nutrientes originales de la leche, aproximadamente 6,3 g/kg de leche según Walstra y col. (11).

Las etapas básicas seguidas en la elaboración de todos los quesos dependen del sistema empleado para desestabilizar las caseínas y formar la cuajada, que según Henning y col. (12) se resumen en tres posibles métodos: acidificación directa o mediante cultivo iniciador, proteólisis limitada empleando enzimas o por una combinación de ambos. En la elaboración de quesos mediante la acidificación de la leche se obtiene una cuajada sin fosfato cálcico y un suero ácido con mayor contenido de minerales, cuyo pH será = 4,6 si la acidificación se realiza por adición directa de algún ácido orgánico o mineral, o será = 5,6 si la acidificación se logró por la acción de bacterias ácido lácticas (BAL). Ambos sueros se conocen como sueros “ácidos”.

Cuando participan enzimas en la desestabilización de las caseínas, la cuajada obtenida está formada principalmente por paracaseína y el suero se caracteriza por poseer un pH=5,6 por lo cual se le identifica como suero “dulce”. Este último puede presentar variaciones en su composición dependiendo, por una parte, de si hubo o no acción de las BAL durante el proceso de manufactura antes de la separación del suero, y por otra, del tipo de cuajo empleado.

Las diferencias en composición de ambos tipos de suero, dulce y ácido, han sido ampliamente estudiadas, en general, el suero dulce tiene un pH más elevado, mayor contenido de sólidos totales, proteínas, lactosa y lípidos, pero menor de calcio y fósforo que los sueros ácidos. El suero dulce tiene mayor contenido de péptidos y aminoácidos debido a la proteólisis producida por el cuajo (13).

En general, en todos los tipos de suero, la lactosa constituye el 75% de los sólidos, sin embargo, el resto de los sólidos representan una excelente fuente de proteínas, lípidos, vitaminas y minerales, cuya importancia ha sido reconocida en los últimos años (14). Entre las principales fracciones proteicas de la leche liberadas en el suero, se encuentran en mayor cantidad las proteínas globulares solubles β -lactoglobulina (β -LG) y β -lactalbúmina (α -LA) en una relación 3:1 y como constituyentes menores

seroalbúmina, inmunoglobulinas, lactoferrina, proteosapeptonas y transferrina (15); en total ellas representan el 98% de la proteína soluble. Esto es equivalente a 6 g por cada kilogramo de leche completa, empleada en la fabricación de los quesos (16,17). Todas estas proteínas están presentes en los tipos de lactosuero mencionados.

Adicionalmente a estas proteínas, en el suero derivado de quesos obtenidos por la acción de la quimosina, se encuentra la porción hidrosoluble de la k-caseína conocida como glicomacropéptido (GMP). La quimosina rompe, preferentemente, el enlace Phe-Met (105-106) de la k-caseína de la leche, obteniéndose dos fracciones: GMP, porción hidrofílica de carácter ácido, constituida por 64 aminoácidos (f106-169), y una porción hidrofóbica, de carácter básico, compuesta por 105 aminoácidos, llamada paracaseína-k, la cual forma parte integral de la cuajada a partir de la cual se obtienen los distintos tipos de quesos (18). El GMP representa entre un 20% y 25% de la proteína total presente en el suero (19).

La fermentación por las BAL y/o de otras bacterias presentes en la leche, también produce variaciones en el perfil peptídico del lactosuero, sugiriendo que la proteólisis microbiana puede ser una fuente potencial de péptidos bioactivos. Por ejemplo, LeBlanc y col. (20) trabajando con *Lactobacillus helveticus*, principal componente del cultivo iniciador empleado en la producción de quesos suizos, obtuvieron lactosuero con una fracción peptídica que presentó múltiple actividad biológica.

La aplicación de procesos industriales actuales permite la recuperación de las proteínas y péptidos del suero, sin desnaturalizarlas y conservando su actividad biológica. Algunos de los procesos unitarios empleados para la concentración, transformación, fraccionamiento y deshidratación del suero incluyen: 1) técnicas de electrodiálisis y nanofiltración para su desmineralización y aplicación como ingrediente en formulaciones especiales infantiles y para pacientes clínicos; 2) otros procesos de membrana, incluyendo microfiltración y ultrafiltración (MF/UF), para el desarrollo de ingredientes funcionales de suero, altos en proteínas y bajos en grasa; y 3) diversos procesos de secado (17,21). La composición del producto final dependerá de la tecnología empleada en la concentración de las proteínas del suero. Por ejemplo, en la producción comercial de aislado de proteína de suero (WPI) mediante cromatografía de intercambio iónico (IEC) se obtiene un producto con una menor proporción de inmunoglobulinas y glicomacropéptido (GMP), en comparación con los WPI obtenidos por procesos de MF/UF (22).

En el caso del GMP, numerosos estudios resumidos por Thomä-Worringer y col. (19), han resaltado sus múltiples

aplicaciones: enlazador o secuestrante de enterotoxinas de cólera y *E. coli*, inhibidor de la adhesión bacteriana y viral, modulador de respuestas del sistema inmune, promotor del crecimiento de bifidobacterias, supresor de secreciones gastrointestinales y regulador de la circulación sanguínea; todas estas aplicaciones son facilitadas por las características funcionales del GMP, principalmente su alta solubilidad y propiedades emulsificantes.

Ahora bien, la mayor parte de las actividades biológicas atribuidas a los compuestos nitrogenados presentes en el suero de leche se deben principalmente a péptidos de menor tamaño (3 a 10 aminoácidos). La actividad biológica de estos péptidos se encuentra en estado latente, cuando están conformando la estructura proteica más compleja, y es activada solamente cuando esa estructura se rompe por acción enzimática (5).

Tipos de péptidos bioactivos encontrados en el suero

En resumen, estos péptidos precursores pueden ser liberados por: a) hidrólisis enzimática durante la digestión gastrointestinal; b) fermentación de la leche por cultivos iniciadores proteolíticos aplicados durante el procesamiento; o c) hidrólisis por enzimas proteolíticas derivadas de microorganismos o plantas (3,5). Ésta última ha sido la de mayor aplicación en los trabajos recopilados. Las propiedades del hidrolizado dependerán del tipo de enzima empleado, el grado de hidrólisis, las condiciones del proceso y el pretratamiento del sustrato (23).

Trabajos más recientes, como el de Fong y col. (24), han permitido visualizar un mapa comprensivo de la proteómica del lactosuero, con la cual se logra observar rápidamente la distribución de las proteínas y sus fracciones. Según estos autores, tal mapa sería útil para diseñar estrategias para la purificación de fracciones proteicas específicas que contengan bioactividades de interés.

A diferencia de las caseínas, los péptidos bioactivos obtenidos a partir de proteínas del lactosuero, así como sus efectos fisiológicos, han sido menos estudiados y caracterizados (25). A continuación se resumen algunos de estos estudios:

1. Péptidos antihipertensivos (Hipotensivos):

La enzima conocida como enzima convertidora de la angiotensina (ACE; peptidildipéptido hidrolasa, EC 3.4.15.1) juega un papel importante en la regulación de la presión sanguínea en mamíferos, catalizando la conversión de la angiotensina I (un decapeptido) en el potente vasoconstrictor angiotensina II (un octapeptido), y al mismo tiempo inactivando al vasodilatador bradykinina (26). De esta forma, la ACE juega un importante papel

fisiológico en la regulación de la presión sanguínea y el balance salino de los fluidos en mamíferos. En el caso de los individuos que sufren de hipertensión se hace imperativo controlar la actividad de esta enzima. El sitio activo de la enzima ACE está constituido por tres subsitios (S1, S1', S2') en los cuales se acoplan los tres residuos hidrofóbicos C-terminales de su sustrato, la angiotensina I, donde son luego "cortados" los dos últimos residuos aminoácidos produciendo la angiotensina II. De acuerdo a la evidencia acumulada hasta el momento, los péptidos que muestran actividad inhibidora de la ACE poseen residuos hidrofóbicos, tales como triptófano (Trp), tirosina (Tyr) o fenilalanina (Phe), en por lo menos una de las tres posiciones C-terminales con los cuales se unen a los sitios activos de la ACE, bloqueando su actividad (27-30). Se ha observado que secuencias de péptidos de cadena corta que portan residuos de prolina (Pro), en combinación o no con residuos hidrofóbicos, también tienen actividad inhibidora de la ACE (2,27). Adicionalmente, la potencia inhibidora se puede incrementar con la presencia, en esta posición terminal, de las cargas positivas de Lys (grupo ε-amino) y Arg (grupo guanidino) (31). En general, se reconoce que con respecto al peso molecular, los péptidos cortos (< 3 kDa) ofrecen consistentemente una mayor actividad inhibidora de la ACE (32).

El procedimiento de obtener, aislar e identificar péptidos con actividad biológica, incluyendo la antihipertensiva, en general, es muy similar entre los distintos trabajos revisados: en primer lugar se trabaja con una solución de 1% a 2% de proteínas del suero, a la cual se le adiciona una enzima específica y se incuba por un tiempo determinado para obtener el grado de hidrólisis deseado. Luego se fracciona el hidrolizado por cromatografía de exclusión (SEC) y/o por cromatografía líquida semi-preparativa en fase inversa (RP-HPLC), seleccionándose la fracción con mayor actividad *in vitro*, es este caso actividad inhibidora ACE, y finalmente se identifica la secuencia de los péptidos responsables de dicha actividad aplicando espectrometría de masas (LC-MS/MS) y/o secuenciación N-terminal (33,28,34). Ahora bien, los hidrolizados son mezclas complejas y pueden contener hasta cientos de diferentes moléculas, por lo cual, localizar péptidos bioactivos en este tipo de muestras ha sido comunmente una tarea difícil y que requiere mucho tiempo y dedicación. Las fracciones usualmente contienen aún múltiples compuestos que requieren ciclos adicionales de fraccionamiento, concentración y evaluación de bioactividad para lograr identificar la molécula responsable de dicha actividad (35).

Otte y col. (28) obtuvieron cuatro potentes péptidos inhibidores de la ACE a partir de un hidrolizado de α-lactalbúmina catalizado con termolisina, todos ellos contenían la misma secuencia Pro-Glu-Trp en su extremo C-

terminal. En estudio realizado con la b-Lactoglobulina (b-Lg), Murakami y col. (27) identificaron un tetrapéptido conformado por los residuos de aminoácidos Ala-Leu-Pro-Met f (142-145) al cual denominaron "b-lactosina B" para distinguirla del péptido "b-lactosina A" proveniente del f(78-80), previamente identificado en la misma proteína. La b-lactosina B mostró una fuerte actividad hipotensiva al ser administrada por vía oral a ratas espontáneamente hipertensivas (SHR), efecto atribuido por los autores al residuo de prolina presente en el tetrapéptido. En general, se ha encontrado que calentando la b-Lg durante los tratamientos enzimáticos (60 a 80°C) se favorece la formación de péptidos con actividad inhibidora de la ACE, y como un ejemplo de esto se menciona al fragmento Leu-Glu-Lys-Trp obtenido bajo estas condiciones y que ha sido descrito como un potente inhibidor ACE (36).

Un potente péptido ACE-inhibidor formado por el fragmento f(108-110 k-caseína) del GMP, el cual corresponde a Ile-Pro-Pro, fue purificado a partir de una bebida láctea japonesa; y en estudios controlados, se ha encontrado que la presión sanguínea de pacientes hipertensos disminuyó significativamente después de 4-8 semanas de ingesta diaria de 95 mL de leche agria conteniendo este péptido (37). Se ha reportado así que, en comparación con el GMP intacto, los hidrolizados tripticos del GMP exhibieron niveles más altos de actividad inhibidora-ACE (19).

2. Péptidos opioides:

Receptores opioides, localizados en el sistema endocrino nervioso y en el tracto digestivo de mamíferos, están vinculados con el control de la motilidad intestinal, comportamiento emocional, analgesia y saciedad. Dichos receptores interactúan con ligandos endógenos (endorfinas) o exógenos (exorfinas) conocidos como péptidos opioides, los cuales tienen actividades agonísticas o antagonísticas; todos ellos tienen en común la presencia de un residuo Tyr en la posición N-terminal, junto con la presencia de otro residuo aromático, como Phe o Tyr, en la tercera o cuarta posición (37). Las exorfinas con actividad agonística exhiben propiedades farmacológicas similares al opio (morfina), mientras que aquellas con actividad antagonística ejercen un efecto inhibitorio similar a la naloxona, una droga empleada para contrarrestar el efecto del opio o compuestos similares, como en el caso de una sobredosis con heroína (2).

Sipolay col. (38) estudiaron el efecto de dos tetrapéptidos, α-lactorphin (Tyr-Gly-Leu-Phe) y b-lactorphin (Tyr-Leu-Leu-Phe), correspondientes a las secuencias de aminoácidos 50-53 de la α-lactalbúmina y 102-105 de la β-lactoglobulina, respectivamente, liberadas mediante proteólisis enzimática con pepsina y tripsina. Ambos tetrapéptidos se unen a receptores opioides y muestran

una débil actividad opioide *in vitro*. Ellos demostraron que ambos tetrapéptidos mejoraron la relajación dependiente del endotelio *in vitro* en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), pero no en ratas normotensivas (WKY). Por su parte, Ijäs y col. (39) mediante administración subcutánea de α -lactorphin en ratas produjeron una disminución de la presión arterial a través de la estimulación de receptores opioides, induciendo la liberación de óxido nítrico (NO) en el tejido vascular, lo cual causa a su vez vasodilatación. Estos autores demostraron que la estimulación de los receptores opioides por parte de la α -Lactorfina no afectó la coordinación motora ni la temperatura corporal, es decir, no tuvo efecto opioide. Los dos trabajos arriba mencionados parecen señalar que los péptidos derivados del lactosuero realmente no tienen un efecto opioide como tal, sino que su interacción con receptores opioides tiene efecto vasodilatador, reduciendo así la presión arterial.

3. Péptidos antioxidantes:

Los radicales libres causan en un producto alimenticio la oxidación de lípidos, desarrollando rancidez y reduciendo la vida útil del alimento; en los consumidores de productos que los contienen, los radicales libres modifican el ADN, proteínas y otras pequeñas moléculas celulares, pudiendo así jugar un papel significativo en el desarrollo de enfermedades (40). Péptidos antioxidantes son aquellos péptidos, de 4 a 20 kDa, que tienen la habilidad de inhibir los daños causados por la oxidación lipídica. Esta habilidad parece estar relacionada con la presencia de ciertos residuos de aminoácidos, tales como tirosina, metionina, histidina, lisina y triptófano, los cuales pueden quelar iones metálicos pro-oxidantes (41), capturar radicales libres y/o extinguir el oxígeno reactivo (26). Estudios recientes han demostrado que después de la hidrólisis, ciertos péptidos resultantes pueden actuar como antioxidantes en sistemas modelo, pudiendo ser empleados como antioxidantes naturales en productos alimenticios. Peña-Ramos y Xiong (42) encontraron que en un hidrolizado de proteína de suero están presentes péptidos tanto antioxidantes como pro-oxidantes, por lo que el efecto esperado como antioxidante se ve reducido por el efecto antagonista de ambos compuestos. Ellos recomendaron continuar estudios para lograr separar ambos y evaluar mejor el efecto de cada fracción. Según Virtanen y col. (41) hasta la fecha solo unos pocos péptidos antioxidantes han sido identificados en productos lácteos fermentados. Peng y col. (40) obtuvieron, hidrolizando un aislado de proteína de suero (WPI) mediante tratamiento enzimático con Alcalasa, cuatro fracciones con péptidos de diferentes pesos moleculares. La fracción con péptidos en el rango de 0,1 a 2,8 kDa mostró un efecto reductor de radicales libres significativamente mayor que las otras fracciones con péptidos de mayor tamaño. Estos autores están

trabajando actualmente en la identificación de la secuencia de aminoácidos de estos péptidos. Se ha mencionado que la actividad antioxidante de los péptidos derivados del lactosuero esté relacionada con la presencia de cisteína la cual promueve la síntesis de glutatiónato, un potente antioxidante intracelular (26). Bayram y col. (43) obtuvieron resultados similares comparando la actividad antioxidante de las proteínas del suero con la de sus hidrolizados. Sus resultados sugieren que la actividad antioxidante es inherente a la secuencia de péptidos en la β -Lactoglobulina.

4. Péptidos antimicrobiales:

Estos péptidos están constituidos por cadenas cortas de aminoácidos con características hidrofóbicas y carga positiva, lo que les permite alterar la bicapa lipídica de los microorganismos, causando una modificación similar a la producida por las proteínas de canal, lo cual conlleva a la muerte de la célula debido a la pérdida de iones y sustancias metabólicas (44). La lactoferrina presente en el lactosuero siempre se ha reconocido como la proteína antimicrobiana de la leche; estudios recientes han reportado la generación de un potente péptido bactericida generado por degradación de la lactoferrina con pepsina, denominado lactoferricina B, efectivo contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (8). López-Expósito y Recio (45) mencionan otro fragmento designado como lactoferrampina, f(268-284) de la lactoferrina, el cual posee actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. De igual forma, se han descrito otros péptidos originados a partir de la hidrólisis de otras proteínas u oligopéptidos del lactosuero, como la Kappacina, fragmento f(138-158) del Glicomacropéptido que fue identificado por Rizzello y col. (46), caracterizado por poseer un residuo fosforilado de serina (Ser) y por acumularse sobre la membrana celular formando un poro aniónico, lo que lo hace un potente péptido antibacterial contra bacterias Gram-positivas (*Streptococcus mutans*) y Gram-negativas (*Pseudomonas gingivalis* y *E. coli*). La digestión con tripsina de la β -Lactoglobulina y de la α -Lactalbúmina, genera respectivamente, cuatro y dos péptidos con efecto antimicrobiano contra bacterias Gram-positivas (9).

5. Péptidos antitrombóticos:

Una complicación relacionada con enfermedades cardiovasculares es la tendencia a formar trombos debido a anomalías en la coagulación, lo cual ha sido asociada con hiperactividad plaquetaria, altos niveles de proteínas hemostáticas (fibrinógeno), fibrinólisis defectiva e hiperviscosidad de la sangre (26). Los péptidos antitrombóticos pueden inhibir la agregación plaquetaria debido a la analogía de su estructura con el fragmento 400-411 del la cadena g del fibrinógeno ; de esta forma el

péptido inhibe la unión del fibrinógeno con su receptor plaquetario, lo cual de otra forma estimularía la agregación plaquetaria dando origen así a la fibrina responsable de la formación de trombos (19). Se han derivado péptidos antitrombóticos a partir del glicomacropéptido, reportándose la inhibición de la agregación plaquetaria (8). Se ha demostrado que los residuos 106-116 de la κ -caseína bovina (casoplatelina) inhiben la agregación plaquetaria inducida por ADP y la unión de fibrinógeno, por un mecanismo dependiente de la concentración (47). Thomä-Worringer y col. (19) también reportaron que los péptidos derivados del GMP, producidos por hidrólisis trípica, inhiben la agregación plaquetaria *in vitro*.

6. Péptidos inmunomoduladores:

Estos pueden jugar un papel importante en la modulación de la respuesta inmunológica, estimulando la fagocitosis en macrófagos y la proliferación de linfocitos. Se han propuesto diversas hipótesis para explicar la acción de estos péptidos, una de ellas propone la estimulación de la proliferación y maduración de células T y otras células fagocíticas para la defensa contra infecciones (48,20). Se ha demostrado que varios componentes lácteos modulan la proliferación *in vitro* de linfocitos, por ejemplo, la lactoferrina B promueve la actividad fagocítica de los neutrófilos humanos; pequeños péptidos derivados del extremo N-terminal de la α -lactalbúmina bovina aumentan significativamente la proliferación de linfocitos sanguíneos periféricos humanos. Sin embargo, el mecanismo por el cual estos péptidos ejercen su efecto inmunopotenciador no se conoce en la actualidad (8); en principio se ha propuesto (48) que estos péptidos podrían interactuar con el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT). Uno de los intentos recientes en este sentido lo representa el trabajo del grupo de Mercier y col. (49) quienes encontraron evidencia soportando su hipótesis de trabajo de que algunos péptidos de cadena corta (<5kDa) obtenidos a partir de la hidrólisis enzimática de las proteínas del suero, estimulan la proliferación de las células del sistema inmunológico. Posteriormente, el mismo grupo de trabajo (50) sugiere que los péptidos liberados de las proteínas del suero debido a la acción de proteasas intestinales pueden estimular el sistema inmunológico aumentando significativamente la secreción de citoquina Th1, jugando así un importante papel en la lucha contra las infecciones. En ninguno de estos trabajos se menciona la secuencia de aminoácidos de los péptidos a los que se le pueda atribuir dicha actividad.

Productos lácteos bioactivos en el mercado

En la actualidad, los péptidos bioactivos obtenidos a partir del suero, son constituyentes fundamentales de algunos productos comercializados como "Alimentos Funcionales" o "Nutraceúticos", en los cuales son añadidos o

enriquecidos modificando los procesos usuales de manufactura. Estos alimentos funcionales que contienen péptidos bioactivos, se pueden desarrollar mejorando la bio-disponibilidad de los mismos en productos lácteos existentes o "creando" nuevos a través de la adición o fortificación de fracciones aisladas de estos péptidos (2). Con base a esto, se puede considerar al suero de leche con péptidos bioactivos como un ingrediente funcional. Un ejemplo de esto lo constituye el ingrediente, Biozate 1, desarrollado por el equipo de Gauthier y Pouliot (23) con aislamiento de proteína de lactosuero (WPI) hidrolizado enzimáticamente, que demostró en pruebas clínicas una significativa disminución de la presión arterial en sujetos que presentaban inicios de la enfermedad y que no habían recibido tratamiento médico.

Por otra parte, se han encontrado una variedad de péptidos naturalmente formados en productos lácteos fermentados, tales como yogurt, crema agria y queso, cuyo beneficio para la salud no ha sido establecido, además, existen ya en el mercado productos lácteos complementados con péptidos bioactivos derivados de la leche cuyos efectos sobre la salud han sido documentados en estudios clínicos humanos. Esto último se logra gracias a las tecnologías industriales disponibles actualmente para la producción comercial de péptidos lácteos bioactivos basados en métodos de separación por membranas y de cromatografía de intercambio iónico (3). Ejemplo de esto son los productos lácteos fermentados registrados como CALPIS®, comercializado en Japón, y EVOLUS®, comercializado en Finlandia, los cuales contienen péptidos con actividad antihipertensiva comprobada (28).

Conclusiones

Todos estos trabajos demuestran el gran potencial que tienen las proteínas del lactosuero como fuente de péptidos bioactivos en la prevención de desórdenes fisiológicos que alteran el funcionamiento normal del organismo. Como lo mencionan muchos de estos autores, todavía queda mucho trabajo de investigación por desarrollar, incluyendo pruebas clínicas en vivo con humanos para confirmar su efecto benéfico. A medida que se tengan más estudios *in vivo* o con humanos, se motivará a la industria para la producción de alimentos funcionales a base de lactosuero hidrolizado con péptidos bioactivos y a introducir en el mercado alternativas más saludables para el consumidor.

Referencias

1. Bauman D, Mather I, Wall R, Lock A. *Major advances associated with the biosynthesis of milk*. J Dairy Sci 2006;89:1235-43.
2. Hartmann R, Meisel H. *Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications*. Curr Opin Biotechnol 2007; 18: 163-69.

3. Korhonen H, Pihlanto A. *Bioactive peptides: production and functionality*. Int Dairy J 2006; 16: 945-60.
4. Torres-Llanez M, Vallejo-Córdoba B, González-Córdoba A. *Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche*. Arch Latinoam Nutr 2005; 55: 111-17.
5. Haque E, Chand R. Milk protein derived bioactive peptides. [En línea] 2006 [Citado 2007 nov 16] Se consigue en: URL: <http://www.dairyscience.info/biopeptides.htm>.
6. Kitts D, Weiler K. *Bioactive proteins and peptides from food source*. Curr Pharm Des 2003; 9: 1309-23.
7. Madureira A, Pereira C, Gómes A, Pintado M, Malcata F. *Bovine whey proteins - overview on their main biological properties*. Food Res Int 2007; 40: 1197-211.
8. Clare D, Swaisgood H. *Bioactive milk peptides: a prospectus*. J Dairy Sci 2000;83: 1187-95.
9. Chatterton D, Smithers G, Roupas P, Brodtkorb A. *Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin - technological implications for processing*. Int Dairy J 2006; 16: 1229-40.
10. Gómez R, González G, Mejía A, Ramírez A. *Proceso biotecnológico para la obtención de una bebida refrescante y nutritiva*. Interciencia 1999; 24:205-10.
11. Walstra P, Geurts T, Noomen A, Jellema A, van Boekel M. *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. 1a ed. Zaragoza : Editorial Acribia; 2001.
12. Henning D, Baer R, Hassan A, Dave R. *Major advances in concentrated and dry milk products, cheese and milk fat-based spreads*. J Dairy Sci 2006; 89: 1179-88.
13. Schmidt R, Packard V, Morris H. *Effect of processing on whey protein functionality*. J Dairy Sci 1984; 67: 2723-33.
14. Walzem R, Dillard C, German J. *Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking*. Crit Rev Food Sci 2002; 42: 353-75.
15. Bordin G, Cordeiro-Raposo F, de la Calle B, Rodriguez A. *Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography*. J Chromatogr A 2001;928:63-76.
16. Prudencio I, Schwinden E, Fortes E, Tomazi T, Bordignon-Luiz M. *Petit suisse manufactures with cheese whey retentate and application for betalains and anthocyanins*. LWT 2008; 41: 905-10.
17. Smithers G. *Whey and whey proteins - from 'gutter-to-gold'*. Int Dairy J 2008; 18: 695-704.
18. Galindo-Amaya L, Valvuenza-Colmenares E, Rojas-Villarreal E. *Estandarización de la detección del glicomacropéptido por PAGE-SDS como índice de adulteración de leche*. Rev Científica 2006;16: 308-14.
19. Thomä-Worringer C, Sorensen J, López-Fandiño R. *Health effects and technological features of caseinomacropéptide*. Int Dairy J 2006;16: 1324-33.
20. LeBlanc J, Matar C, Valdéz J, LeBlanc J, Perdigon G. *Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with Lactobacillus helveticus*. J Dairy Sci 2002;85: 2733-42.
21. Yorgun M, Balcioglu I, Saygin O. *Performance comparison of ultrafiltration, nanofiltration and reverse osmosis on whey treatment*. Desalination 2008; 229:204-16.
22. Ben Ounis W, Gauthier S, Turgeon S, Roufik S, Pouliot Y. *Separation of minor protein components from whey protein isolates by heparin affinity chromatography*. Int Dairy J 2008;18:1043-50.
23. Gauthier S, Pouliot Y. *Functional and biological properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins*. J Dairy Sci (E. suplemento) 2003;86: E78-87.
24. Fong B, Norris C, Palmano D. *Fractionation of bovine whey proteins and characterisation by proteomic techniques*. Int Dairy J 2008;18: 23-46.
25. Antila P, Paakkari I, Järvinen A, Mattila M, Laukkanen M, Pihlanto M et al. *Opioid peptides derived from in vitro proteolysis of bovine whey protein*. Int Dairy J 1991; 1: 215-29.
26. Erdmann K, Cheung B, Schroder H. *The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease*. J Nutr Biochem 2008;19: 643-54.
27. Murakami M, Tonouchi H, Takahashi R, Kitazawa H, Kawai Y, Negishi H et al. *Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (β -lactosin B) isolated from a commercial whey product*. J Dairy Sci 2004;87: 1967-74.
28. Otte J, Shalaby S, Zakora M, Nielsen M. *Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from α -lactalbumin and β -casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis*. Int Dairy J 2007;17: 1460-72.
29. Vinderola G, de LeBlanc A, Perdigon G, Matar C. *Biologically Active Peptides Released in Fermented Milk: Role and Functions*. En: Farnworth E, editor. *Handbook of fermented functional foods*. Boca Ratón : CRC Press;2008.
30. Abubakar A, Saito T, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. *Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase k digestion*. J Dairy Sci 1998;81: 3131-38.
31. Hernández-Ledezma B, Recio I, Amigo L. *β -lactoglobulin as source of bioactive peptides*. Amino Acids 2008;35: 257-65.
32. Lignitto L, Cavatorta V, Balzan S, Gabai G, Galaverna G, Novelli E et al. *Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of water-soluble extracts of asiago d'allevio cheese*. Int Dairy J 2010;20:11-17.
33. Tsai J, Chen T, Pan B, Gong S, Chung M. *Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk*. Food Chem 2008;106: 552-58.
34. Hernández-Ledezma B, Amigo L, Ramos M, Recio I. *Application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion*. J Chromatogr A 2004; 1049: 107-14.
35. Van Elswijk D, Diefenbach O, van der Berg S, Irth H, Tjaden U, van der Greef J. *Rapid detection and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitors by on-line liquid chromatography-biochemical detection, couple to electrospray mass spectrometry*. J. Chromatogr A 2003;1020: 45-58.
36. Hernández-Ledezma B, Ramos M, Recio, I, Amigo L. *Effect of β -lactoglobulin hydrolysis with thermolysin under denaturing temperatures on the release of bioactive peptides*. J Chromatogr A 2006;1116: 31-7.
37. Silva S, Malcata X. *Caseins as source of bioactive peptides*. Int Dairy J 2005;15: 1-15.
38. Sipola M, Finckenberg P, Vapaatalo H, Pihlanto-Lappälä A, Korhonen H, Korpela R et al. *α -lactorphan and β -lactorphan improve arterial function in spontaneously hypertensive rats*. Life Sci 2002;71:1245-53.
39. Ijäs H, Collin, M, Finckenberg P, Pihlanto-Leppälä A, Korhonen H, Korpela R et al. *Antihypertensive opioid-like milk peptide α -lactorphan: lack of effect on behavioural tests in mice*. Int Dairy J 2004;14: 201-5.
40. Peng X, Xiong Y, Kong B. *Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance*. Food Chem 2009;113: 196-201.
41. Virtanen T, Pihlanto A, Akkanen S, Korhonen H. *Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria*. J Appl Microbiol 2007;102: 106-15.
42. Peña-Ramos E, Xiong Y. *Antioxidative activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system*. J Dairy Sci 2001;84:2577-83.
43. Bayram T, Pekmez M, Arda N, Yalcin A. *Antioxidant activity of whey protein fractions isolated by gel exclusion chromatography and protease treatment*. Talanta 2008;75: 705-9.
44. Villarruel R, Huizar R, Corrales M, Sánchez T, Islas A. *Péptidos naturales antimicrobianos: escudo esencial de la respuesta inmune*. Investigación en Salud 2004; VI: 170-9.
45. López-Expósito I, Recio I. *Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins*. Int Dairy J 2006;16:1294-305.

46. Rizzello C, Losito I, Bobbetti M, Carbonara T, De Bari M, Zamboni P. *Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of italian cheese varieties*. J Dairy Sci 2005;88:2348-60.
47. Fiat A, Migliore-Samour D, Jollés P, Dronet L, Sollier C, Caen J. *Biological active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities*. J Dairy Sci 1993;76:301-10.
48. Kayser H, Meiser H. *Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins*. FEBS Letters 1996; 383:18-20.
49. Mercier A, Gauthier S, Fliss I. *Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests*. Int Dairy J 2004;14:175-83.
50. Saint-Sauveur D, Gauthier S, Boutin Y, Montoni A. *Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions*. Int Dairy J 2008; 18:260-70.

Recibido: 26-05-2010
Aceptado: 30-06-2010