

## Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche

*María de Jesús Torres-Llenez, Belinda Vallejo-Cordoba y Aarón Fernando González-Córdova*

Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos, Departamento de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (DTAOA), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.). Hermosillo, Sonora. México

**RESUMEN.** Las proteínas lácteas son conocidas por tener propiedades nutricionales, funcionales y biológicas que hacen de ellas ingredientes importantes en alimentos funcionales promotores de la salud. Estas propiedades son parcialmente atribuidas a los péptidos bioactivos codificados en las diferentes proteínas de la leche. Los péptidos bioactivos, son inactivos dentro de la secuencia de la proteína intacta y pueden ser liberados por acción de enzimas proteolíticas nativas de la leche, enzimas de bacterias ácido lácticas o de fuentes exógenas, durante la digestión gastrointestinal o durante el proceso del alimento. Los péptidos derivados de las proteínas caseicas y séricas han demostrado poseer varias propiedades bioactivas como lo son: opioide, antihipertensiva, antimicrobial, inmunomoduladora, transporte de minerales y antitrombótica. Esta revisión presenta una perspectiva de la importancia de las proteínas lácteas en la producción de péptidos bioactivos y sus actividades biológicas, así como de las principales técnicas utilizadas para el aislamiento e identificación de estos péptidos.

**Palabras clave:** Péptido bioactivo, proteólisis, proteínas de la leche.

**SUMMARY.** Bioactive peptides derived from milk proteins. Milk proteins are known for having a wide range of nutritional, functional and biological properties that make them important ingredients in functional or health promoting foods. These properties are partly attributed to bioactive peptides coded in the different milk proteins. Bioactive peptides are inactive within the protein sequence but may be released by the action of native proteolytic enzymes from milk, enzymes from lactic acid bacteria or from exogenous sources or may be produced during gastrointestinal digestion or processing of foods. Peptides derived from caseins and whey proteins were shown to present several bioactive properties such as opioid, antihypertensive, antimicrobial, immunodulatory, mineral carrier and antithrombotic. This overview presents a perspective of the importance of dairy proteins in the production of bioactive peptides and their biological activities, as well as the main analytical techniques that have been used for the isolation and identification of these peptides.

**Key words:** Bioactive peptide, proteolysis, milk proteins..

### INTRODUCCION

La leche contiene elementos nutritivos, da protección inmunológica y suministra sustancias biológicas activas tanto a neonatos como a adultos. En general, las principales fracciones proteicas de la leche de vaca incluyen  $\alpha$ -lactalbúmina ( $\alpha$ -LA),  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG), caseínas (CN), inmunoglobulinas (Ig), lactoferrina (LF), fracciones de péptido-proteosa (estables al calor), fosfoglicoproteínas (solubles en ácido), y proteínas séricas menores tales como: transferrina y albúmina sérica (1). De estas fracciones, los péptidos bioactivos pueden ser generados por proteólisis enzimática, ya sea durante la digestión gastrointestinal o por efecto del proceso de los alimentos (2). El calificativo "bioactivo" es comúnmente utilizado para describir proteínas y péptidos con diversos tipos de actividad biológica. Se ha encontrado que los péptidos bioactivos obtenidos de las proteínas de la leche presentan funciones antimicrobiales, inmunomoduladoras, antitrombóticas y de transporte de minerales. También se ha encontrado que son capaces de disminuir la presión sanguínea de sujetos hipertensos y actuar como opioides (3).

Los péptidos bioactivos se encuentran en la leche, en leches fermentadas, quesos y sueros derivados de quesería (4-8). Las enzimas proteolíticas de la leche, las enzimas provenientes de las bacterias ácido lácticas (BAL) y las provenientes de fuentes exógenas contribuyen a la generación de péptidos bioactivos, prestando particular atención a los péptidos producidos por las proteinasas de las BAL que actúan sobre las proteínas de la leche (9).

Estudios de péptidos bioactivos provenientes de las proteínas lácteas han sido publicados en años recientes (10-13). Se le ha dado un énfasis particular al aislamiento de péptidos bioactivos derivados de diferentes tipos de quesos europeos. Últimamente se ha manifestado interés por la caracterización de quesos de origen latinoamericano (14), así como en el uso de cultivos lácticos iniciadores en la elaboración de los mismos (15,16), sin embargo no existe información del aislamiento de péptidos bioactivos en estos tipos de quesos por lo que este sería un campo de investigación por explorar.

### Proteínas y péptidos bioactivos de la leche

La leche contiene moduladores de funciones gastrointestinales y hemodinámicas, hormonas y factores de

crecimiento, además de cumplir con funciones de inmunoregulación como, la defensa contra enfermedades, y modulación de la población de microorganismos intestinales (17). Una característica importante de la modulación involucra la acción antibacteriana frente a patógenos intestinales, coliformes y la acción prebiótica, estimulando el crecimiento de microflora benéfica en el intestino (10).

La bioactividad de la leche es atribuida a las proteínas y péptidos secretados por las glándulas mamarias, la cual está latente, ausente o incompleta en la proteína nativa. Las estructuras de las secuencias biológicamente activas se han obtenido de la digestión enzimática *in vitro* y/o por digestión gastrointestinal *in vivo* de proteínas precursoras (9,18). Una vez que los péptidos son liberados en el cuerpo, ellos pueden actuar como compuestos reguladores con actividad tipo hormonal (9,13). La actividad biológica está relacionada con la composición y secuencia de los aminoácidos presentes. Los péptidos bioactivos usualmente contienen 3 a 20 residuos de aminoácidos por molécula (13).

Las proteínas intactas de la leche presentan gran variedad de actividades biológicas; las inmunoglobulinas tienen un efecto inmunoprotector, la lactoferrina despliegan actividad antibacteriana, mientras que las bajas concentraciones de factores de crecimiento y hormonas, presentes principalmente en calostro, podrían jugar un papel significativo en el desarrollo postnatal (17). Las proteínas de la leche también contienen varias secuencias de péptidos bioactivos los cuales están codificados dentro de la estructura primaria. Varios péptidos derivados de la leche poseen propiedades multifuncionales, por ejemplo, secuencias específicas de péptidos presentan dos o más actividades biológicas. Algunas regiones de la estructura primaria de  $\beta$ -caseína ( $\beta$ -CN) contienen secuencias sobrepuestas, las cuales presentan diferentes efectos biológicos (9,19).

#### **Importancia fisiológica de los péptidos bioactivos derivados de las proteínas lácteas**

Los péptidos bioactivos están ampliamente distribuidos en las proteínas de la leche, lo cual sugiere la importancia fisiológica de estos péptidos. Aunque la potencia de los péptidos derivados de la leche es menor que la de los péptidos utilizados en fármacos, los primeros podrían tener un efecto fisiológico importante debido a que la ingesta de proteínas lácteas es alta atribuible al consumo de leche y productos lácteos. Para que exista un efecto fisiológico *In vivo*, es necesario que los péptidos bioactivos sean liberados durante la digestión y que alcancen el sitio donde ejercen su acción en el tracto intestinal o después de su reabsorción en los órganos periféricos. Además de que se ha demostrado la formación de estos péptidos bioactivos tanto en digestión *in vivo* como *in vitro*, estos también son liberados durante la elaboración de los productos lácteos (13).

**Péptidos opioides.** Los péptidos opioides típicos son conocidos como endógenos y son derivados de encefalinas, endorfinas y dinorfinas. Estos actúan como receptores ligandos de opioides. Los efectos fisiológicos de estos péptidos dependen del tipo de receptor: los receptores  $\mu$  están vinculados al control de la motilidad intestinal y comportamiento emocional, los receptores  $\delta$ , al control del comportamiento emocional y los receptores  $\kappa$  están relacionados con analgesia y saciedad (20). Los péptidos opioides atípicos derivados de las proteínas de la leche, son exógenos; pudiendo presentar actividad agonista o antagonista. Los derivados de la CN, son conocidos como casomorfina y/o casoxinas, mientras que los derivados de las proteínas séricas, son conocidos como lactorfinas. Las  $\beta$ -casomorfina son opioides agonistas y son fragmentos de  $\beta$ -CN (fragmento 60-70) y han sido caracterizados como ligandos tipo- $\mu$ . Otras secuencias de opioides agonistas también han sido identificadas en  $\alpha_s$ -CN, -lactalbúmina, y  $\beta$ -lactoglobulina (12,21). Los opioides antagonistas son derivados de la  $\kappa$ -CN (casoxinas) y  $\alpha_{sv}$ -CN (9,12).

Los péptidos opioides atípicos tienen secuencias N-terminales que difieren de los péptidos opioides endógenos típicos (10). La característica estructural común entre péptidos opioides endógenos y exógenos, es la presencia de un residuo tirosina en el amino terminal (excepto opioides derivados de  $\alpha$ -CN) y la presencia de otro residuo aromático (fenilalanina o tirosina), en la tercera o cuarta posición. Esta es una característica estructural importante que permite ajustar al sitio de unión de los receptores opioides. El potencial negativo, localizado en la vecindad del grupo hidroxil fenólico de tirosina, es esencial para la actividad opioide, cuando no está presente resulta en ausencia total de bioactividad (22-23).

**Péptidos con acción antihipertensiva (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina).** Los péptidos antihipertensivos inhiben la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (peptidildipeptidasa hidrolasa). ECA es una enzima multifuncional que está localizada en diferentes tejidos (plasma, pulmón, riñón, corazón, músculo esquelético, páncreas, cerebro). Esta enzima puede incrementar la presión sanguínea al convertir angiotensina I (decapéptido) en un potente vasoconstrictor, angiotensina II (octapéptido) (24-26).

Varios péptidos inhibidores de ECA han sido identificados en la digestión proteolítica de proteínas de la leche. Los inhibidores de ECA derivados de CN o casoquinina han sido identificados dentro de las secuencias de  $\beta$ -CN y  $\kappa$ -CN. Ellos también han sido derivados por digestión trípica de  $\alpha_{s1}$ -CN y -CN de bovino (10,18). Inhibidores de ECA también han sido obtenidos de leche fermentada "Calpis", la cual es obtenida por la fermentación de leche descremada con *Lactobacillus helveticus* y *Sacharomyces cerevisiae*. Los péptidos que muestran actividad antihipertensiva están formados por Val-

Pro-Pro e Ile-Pro-Pro, estas secuencias de aminoácidos se encuentran en la estructura primaria de  $\beta$ -CN y  $\kappa$ -CN de bovinos, respectivamente (11). También se ha descrito que las proteínas séricas  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG e hidrolizados del suero obtenidos con pepsina, tripsina y quimotripsina, contienen péptidos con acción inhibitoria de ECA (13,27).

Aunque la relación actividad-estructura de los péptidos inhibidores de ECA aun no ha sido establecida, estos péptidos muestran algunas características comunes. La ECA parece tener preferencia por sustratos o inhibidores competitivos con residuos hidrofóbicos (aromáticos o cadenas ramificada) en cada una de las tres posiciones C-terminal. Muchos de los péptidos inhibidores contienen prolina en la posición C-terminal. Casoquininas también contienen lisina o arginina en el residuo C-terminal. La información sobre actividad-estructura sugiere que la carga positiva del grupo guanidino o del grupo  $\epsilon$ -amino de la posición C-terminal de arginina o lisina, respectivamente, contribuyen al potencial inhibitorio (22).

**Agentes inmunomoduladores.** Los péptidos inmunomoduladores presentes en la leche afectan al sistema inmune y a la respuesta de proliferación de células (18,28). Los péptidos inmunoregulatorios obtenidos de  $\beta$ - y  $\alpha_{s1}$ -CN y  $\alpha$ -LA aumentan la fagocitosis y modulan la proliferación y diferenciación de linfocitos. LF intacta o su péptido N-terminal también modula la blastogénesis o diferenciación de linfocitos. Las hormonas, factores de crecimiento y citocinas encontrados en la leche también son importantes en la inmunoregulación y desarrollo inmune (10).

**Péptidos antitrombóticos.** Los péptidos antitrombóticos, las casoplastelinas, son derivadas de la parte C-terminal (caseinoglicomacropéptido) de la  $\kappa$ -CN, inhibiendo la agregación de las plaquetas. Esto es debido a la similitud en la estructura y funcionalidad del dodecapéptido presente en el fibrinogeno humano y el undecapéptido de la  $\kappa$ -CN de bovino (1,18).

A nivel molecular, la coagulación de la sangre y de la leche muestra gran similitud. En la leche el mecanismo de coagulación es definido por la interacción de  $\kappa$ -CN con quimosina y el proceso de coagulación de la sangre, es definido por la interacción de fibrogeno con trombina.

**Péptidos transportadores de calcio (caseinofosfopéptidos).** La caseína contiene fosfato que está unido covalentemente vía uniones monoéster a los residuos de serina, el grado de fosforilación depende de la CN particular. Se han identificado varios fosfopéptidos derivados de la caseína que contienen la secuencia -Ser (P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu. Estos caseinofosfopéptidos (CPPs) son liberados por proteólisis, la presencia de múltiples residuos de fosfatos los convierten en

buenos agentes quelantes de calcio (9,29). Los CPPs juegan un papel preponderante en la absorción de calcio en el intestino delgado y su presencia en la cavidad oral promueve la remineralización del esmalte de los dientes.

**Péptidos con actividad antimicrobiana.** Como un complemento al sistema de defensa contra enfermedades e infecciones bacterianas y vírales, un grupo de proteínas y péptidos se encuentran en la leche y secreciones mamarias. Estas incluyen lactoperoxidasa, lisozima, LF y lactoferrina. Su acción antimicrobial puede ser obtenida tanto en la glándula mamaria como en el tracto gastrointestinal de los lactantes (30,31).

Lactoferrina es un péptido catiónico de bajo peso molecular, compuesto por 25 residuos de aminoácidos. Ocho de los 25 residuos de aminoácidos en este péptido son básicos y esta característica probablemente sea importante en determinar sus propiedades bactericidas potentes (22,32). Las propiedades bactericidas parecen estar correlacionadas con la carga positiva neta del péptido, la cual puede matar microorganismos susceptibles ya que incrementa la permeabilidad de la membrana celular ocasionando su ruptura (9,10,33).

LF exhibe actividad bacteriostática y bactericida frente a un gran rango de microorganismos, es una glicoproteína unida a hierro, es bacteriostático debido a su alta afinidad por  $Fe^{3+}$  y bactericida debido a la habilidad de la LF intacta o a la secuencia cercana a N-terminal de lactoferrina humana o de bovino, en una región distinta de los sitios de unión de hierro, llamada lactoferrina (3). Este péptido es obtenido de la degradación de LF de bovino con pepsina y presenta propiedades bactericidas más potentes que LF.

Algunos péptidos que presentan actividad antimicrobiana, también han sido aislados de  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN, así como de  $\alpha$ -LA. La cesecidina, se obtiene por la digestión de CN con quimosina. Este péptido presenta actividad in vitro contra *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae*, y *Streptococcus pyogenes* (18). La casocidina-I, es un péptido derivado de  $\alpha_{s2}$ -CN (f165-203) que presenta efectos antibacterianos, inhibiendo el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus carnosus* (9). La isracidina es un segmento de  $\alpha_{s1}$ -CN (f1-23) con actividad antibacterial contra *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. La leche también contiene péptidos que exhiben propiedades antifúngicas (3,18).

#### Formación de péptidos bioactivos por BÁL en quesos y suero de quesería

La proteólisis es uno de los fenómenos más importantes que contribuyen al sabor y textura de los diferentes tipos de quesos. Los agentes proteolíticos pueden provenir de diferentes fuentes como: coagulantes de la leche, proteínas

nativas de la leche como plasmina y catepsina D, BAL iniciadoras y no-iniciadoras y sus enzimas (34,35); e iniciadores secundarios, por ejemplo, bacterias ácido propionicas, levaduras, mohos, y sus enzimas (36,37).

La degradación de las proteínas lácteas por proteasas permite la formación de péptidos y aminoácidos, los cuales actúan como compuestos de sabor o como precursores de compuestos del sabor (38-39). Sin embargo, los péptidos liberados de las proteínas alimentarias durante la fermentación, también tienen importancia en la salud ya que pueden propiciar numerosas respuestas fisiológicas en el organismo (9). Estos péptidos bioactivos pueden ser liberados durante la elaboración de productos lácteos (40). Las BAL son conocidas por poseer una variedad de enzimas proteolíticas capaces de utilizar las proteínas como una fuente de nitrógeno para garantizar su crecimiento durante la fermentación (41).

Las BAL son utilizadas en la salud humana ya que su ingestión puede proteger contra varias infecciones virales estimulado al sistema inmune (42,43). En el mismo campo de interés, ha sido mostrado que estas actúan en la prevención de cáncer de colón (44). Los cultivos iniciadores utilizados en la industria láctea son altamente proteolíticos. Además de las proteinasas enlazadas a la pared celular, al menos 16 peptidasas de BAL han sido identificadas y caracterizadas genéticamente. Este sistema provee un mecanismo de transporte específico para aminoácidos, di- y tripéptidos y oligopéptidos liberados de la molécula proteica. En el tracto intestinal, las enzimas digestivas endógenas y las proteasas liberadas por microorganismos colonizadores del intestino, pueden degradar oligopéptidos permitiendo una posible formación de péptidos con bioactividades específicas. Una vez liberados en el intestino, estos péptidos pueden actuar localmente o pasar a través de la pared intestinal a la circulación sanguínea y alcanzar los órganos, con la subsiguiente regulación fisiológica (2,45).

Los CPPs se pueden formar durante la maduración del queso debido a las proteasas (3-4). La presencia de péptidos con actividad antihipertensiva de varios alimentos se debe a que actúan inhibiendo la ECA (46-48). Laffineur y col. (49) mostraron que las BAL son capaces de liberar péptidos de  $\beta$ -CN con actividad inmunomodulatoria. Un estudio realizado por Pihlanto-Leppälä y colaboradores (13) mostró que los cultivos iniciadores de bacterias ácido lácticas fueron capaces de producir péptidos con actividad inhibitoria de ECA solo después de la digestión de la  $\alpha$ -LA y la  $\beta$ -LG, con pepsina y tripsina (27).

Otros péptidos con potente actividad inhibitoria que no habían sido reportados provinieron de la  $\beta$ -CN y de la  $\alpha_1$ -CN. En un estudio similar, se detectaron péptidos obtenidos de leche fermentada con *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*, conteniendo la secuencia de  $\beta$ -lactofina (31). Recientemente, diferentes tipos de quesos como el Gouda,

han sido utilizados como fuente de péptidos con actividad antihipertensiva (6,40). Similarmente, algunos péptidos antihipertensivos como las  $\beta$ -casomorfina, fueron aislados de quesos enzimáticamente modificados (46).

Como se ha mencionado con anterioridad, la hidrólisis de las proteínas de la leche con proteinasas de BAL produce péptidos bioactivos (46,50). El efecto sobre las características sensoriales y químicas que causa el inocular la leche con cultivos iniciadores ha sido ensayado en diferentes tipos de quesos (36,39). Sin embargo, son pocos los datos disponibles acerca del papel que desempeñan los diferentes cultivos iniciadores sobre la producción de péptidos bioactivos (40). En el estudio realizado por Gómez-Ruiz y col. (8) se determinó que la actividad inhibitoria de ECA incrementó con la proteólisis hasta el octavo mes de maduración y empezó a disminuir a los doce meses de maduración del queso Manchego. En este estudio un total de 22 fragmentos de péptidos fueron identificados en nueve fracciones (8).

No solo los quesos son fuentes de péptidos bioactivos, sino también el suero derivado; esto último toma particular importancia debido al incremento del suero como subproducto de la industria quesera (31,51). El suero de bovino contiene proteínas unidas a metales, inmunoglobulinas, factores de crecimiento y hormonas. A varias proteínas del suero se le han atribuido propiedades fisiológicas. Sin embargo, los péptidos bioactivos del suero y sus efectos fisiológicos han sido menos estudiados que los obtenidos de las caseínas. Varios estudios han encontrado secuencias de péptidos con actividad antihipertensiva en proteínas séricas de leche utilizando enzimas digestivas (26) o microbianas o combinación de ambas (27). Los péptidos antihipertensivos también han sido obtenidos por la digestión de proteínas del suero de queso con proteinasa K, obteniéndose un tripéptido a partir de la  $\beta$ -LG (51). Los productos fermentados que presentan péptidos inhibidores de ECA tienen un gran potencial como alimentos funcionales para la prevención de hipertensión.

Algunos de los péptidos obtenidos de proteínas séricas son  $\alpha$ -lactofina,  $\beta$ -lactofina, albutensina A y  $\beta$ -lactensina. Las serorfinas obtenidas de albúmina sérica de bovino presentan actividad opioide. Los péptidos,  $\alpha$ -lactofina,  $\beta$ -lactofina causan la contracción del músculo liso similar a la causada por morfina (52). La literatura menciona que las principales actividades bioactivas del suero son, por un lado, su actividad anticancerosa y, más concretamente, su papel protector frente al cáncer de colon, y por otro lado, su papel como estimulador de la respuesta inmune (53).

En un estudio realizado en queso Emmental se encontró que Catepsina D y proteinasas celulares podrían actuar competitivamente en la degradación de caseínas durante la maduración (54). Se señala que además de la acción de las proteinasas nativas de la leche, los lactobacilos termofílicos presentan un rol significativo en la proteólisis del queso a través

de la acción de sus proteinasas celulares. Estos microorganismos son considerados la especie bacteriana más activa durante la maduración, no solamente debido a su alta actividad proteolítica, sino también debido a su actividad autolítica. Este estudio, también informa que algunas regiones de las caseínas no fueron hidrolizadas, aún cuando eran sitios de ruptura potenciales de las diferentes proteinasas de los lactobacilos, lo que podría estar relacionado a: la modulación de la especificidad de las enzimas del queso por las condiciones fisicoquímicas (pH, actividad de agua, y contenido de minerales y sales) y a la accesibilidad de los sustratos, debido al rearrreglo estructural durante la formación de la matriz caseica y condiciones ambientales en el queso (54,55).

#### Técnicas de aislamiento e identificación de péptidos bioactivos

Los protocolos utilizados para la obtención de péptidos bioactivos consisten en: preparación de extractos acuosos, fraccionamiento por cromatografía por exclusión de tamaño (4,6,27) y HPLC en fase reversa (8,25,46) o electroforesis capilar (6). Para la identificación de la secuencia de los péptidos, se ha utilizado la degradación de Edman o la espectrometría de masas en "tandem" (34).

La actividad potencialmente bioactiva de los péptidos es determinada por comparación de las secuencias encontradas con las reportadas de péptidos bioactivos en bases de datos (55). Aquellos estudios que incluyen la confirmación de la actividad bioactiva de los péptidos *in vivo* o *in vitro*, incluyen a la cromatografía semi-preparativa para la obtención de suficiente material para los ensayos biológicos (6,28,43).

Los protocolos antes descritos, han sido los clásicos, en los cuales las separaciones cromatográficas para el aislamiento y purificación se realizan de manera discontinua. Sin embargo, cuando es necesario realizar una gran cantidad de muestras de manera rápida, el procedimiento descrito no resulta eficiente y se le ha considerado "el cuello de botella" para aquellos que buscan la automatización en el análisis de péptidos. Por estas razones, algunos fabricantes de instrumentación analítica se han enfocado a desarrollar plataformas integradas que abordan el problema de reducir el tiempo de análisis, mientras que otros se han enfocado a mejorar etapas específicas del análisis. Para la identificación sistemática de los péptidos constituyentes en un sistema complejo, las herramientas analíticas que permiten la identificación de las mismas en gran escala y con gran rapidez son la cromatografía bidimensional (2D) como técnica de separación, la espectrometría de masas especializada como técnica de identificación de la secuencia de aminoácidos y la bioinformática para comparar la información estructural generada de la espectrometría de masas a través de las bases de datos (56,57).

Una metodología que presenta ventajas para la separación de péptidos en dos dimensiones, es la cromatografía capilar

de líquidos (2D-LC) con interfase directa con una gran variedad de espectrómetros de masas. Debido a la alta sensibilidad de la LC, y a que todo el análisis es realizado en fase líquida y en línea, estos sistemas (2D-LC-MS) permiten separar hasta péptidos menos frecuentes (56).

Anteriormente, los métodos de identificación de proteínas, consistían en la degradación de Edman y el análisis composicional de aminoácidos, sin embargo ambas metodologías son muy laboriosas y requieren de mucho tiempo. La introducción de los métodos de espectrometría de masas reforzó las estrategias de identificación de péptidos y proteínas; especialmente con el desarrollo del espectrómetro de tiempo de vuelo (TOF) y los métodos de ionización suave, incluyendo el de MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) y la ionización por electroesparado (ESI) (58).

En la identificación de la secuencia de los péptidos por medio de la espectrometría de masas, estos son separados usando cromatografía de líquidos o pueden ser analizados directamente por MS. Los péptidos individuales son separados y fragmentados por colisión con un gas inerte dentro del espectrómetro de masas y las masas de los fragmentos derivados son medidas. La información generada de las masas moleculares se compara con valores teóricos de las bases de datos de péptidos para encontrar la secuencia del péptido e identificar a la proteína enlistada de acuerdo con una exactitud medida estadísticamente por un software especializado (58).

Un método alternativo consiste en la identificación de péptidos usando "tandem" MS y búsqueda en las bases de datos específicas para proteínas. Para este tipo de análisis se utiliza un sistema de cuadrupolo TOF o una trampa de iones. En ambos instrumentos la fragmentación es inducida en una celda de colisión y se miden las masas moleculares de los iones fragmentados. Las masas obtenidas de los iones son comparadas con los valores teóricos de masas de fragmentos de secuencias de proteínas de las bases de datos. Los equipos "tandem" MS en combinación con la cromatografía de líquidos multidimensional permite el análisis eficiente de un gran número de mezclas de péptidos provenientes de la digestión de varias proteínas de sistemas biológicos complejos (58).

## CONCLUSIONES

La leche y derivados lácteos contienen numerosas secuencias peptídicas que determinan funciones fisiológicas importantes y modulan diferentes procesos regulatorios. Las investigaciones realizadas sobre péptidos bioactivos en productos lácteos y derivados indican que, aunque el mecanismo fisiológico de estos péptidos aún no es claro, ofrecen un gran potencial para el desarrollo de alimentos funcionales. Además, la fermentación microbiana es una

tecnología aplicable para la producción de péptidos bioactivos.

Son necesarios trabajos adicionales para establecer la relación estructura-actividad. La investigación en este campo podría aportar al conocimiento de los mecanismos que producen diferentes efectos, así como también las funciones de los péptidos bioactivos derivados de los alimentos.

### AGRADECIMIENTOS

Se agradecen el apoyo económico recibido por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México a través del proyecto 42340-Z.

### REFERENCIAS

- Xu RJ. Bioactive peptides in milk and their biological and health implications. *Food Rev Int.* 1998;14:1-16
- Korhonen H, Pihlanto-Leppälä A. Bioactive peptides: new challenges and opportunities for the dairy industry. *Aust J Dairy Technol.* 2003;5:129-134.
- FitzGerald RJ, Meisel H. Caseinophosphopeptides (CPPs) as functional ingredients. In: *Functional dairy products*. Mattila-Sandholm T, Saarela M, editors. Cambridge UK: Woodhead Publishing Limited; 2003. p.188-202.
- Roudot-Algaron F, LeBars D, Kerhoas L, Einhorn J, Gripon JC. Phosphopeptides from comté cheese: nature and origin. *J Food Sci.* 1994;59:544-547.
- Smacchi E, Gobetti M. Peptides from several italian cheeses, inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 an to the angiotensin I-converting enzyme. *Enzyme Microb Technol.* 1998;22:687-694.
- Saito T, Nakamura T, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in gouda cheese. *J Dairy Sci.* 2000;83:1434-1440.
- Smacchi E, Gobetti M. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiol.* 2000;17:129-141.
- Gómez-Ruiz JA, Ramos M, Recio I. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *Int Dairy J.* 2002;12:697-706.
- Meisel H. Overview on milk protein-derived peptides. *Int Dairy J.* 1998;8:363-373.
- Schanbacher FL, Talhouk RS, Murray FA, Gherman LI, Willett LB. Milk-borne bioactive peptides. *Int Dairy J.* 1998;8:393-403.
- Takano T. Milk derived peptides and hypertension reduction. *Int Dairy J.* 1998;8:375-381.
- Meisel H, FitzGerald RJ. Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *Br J Nutr.* 2000;84(Suppl. 1):S27-S31.
- Pihlanto-Leppälä A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends Food Sci Technol.* 2001;11:347-356.
- Van Hekken D, Farkye NY. Hispanic cheeses: the quest for queso. *Food Technol.* 2003;57:32-38.
- Torres-Llanez MJ. Diseño de un cultivo láctico para la biogeneración del sabor de queso fresco regional. [Tesis de Maestría en Ciencias]: Hermosillo, Sonora: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.; 2002.
- Vallejo-Córdoba B, Torres-Llanez MJ, Mazorra-Manzano MA, González-Cordoba AF. Starter cultures for hispanic-style cheeses: the case of queso-fresco. *American Dairy Science Association Annual Meeting*; 2003 June 22-26; Phoenix, AZ.
- Tomé D, Dehabbi H. Physiological effects of milk protein components. *Int Dairy J.* 1998;8:383-392.
- Clare DA, Swaisgood HE. Bioactive milk peptides: A prospectus. *J Dairy Sci.* 2000; 83:1187-1195.
- Gobetti M, Stepaniak L, De Angelis M, Corsetti A, Di Cagno R. Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2002;42:223-239.
- FitzGerald RJ, Meisel H. Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In: *Advances dairy chemistry. Proteins*. Fox PH, McSweeney PLH, editors. Cambridge UK: Academic/Plenum Publishers. 2003b:675-698.
- Antila P, Paakkari I, Järvinen A, Mattila MJ, Laukkanen M, Pihlanto-Leppälä A, Mäntsälä P, Hellman J. Opioid peptides derived from in-vitro proteolysis of bovine whey proteins. *Int Dairy J.* 1991;1:215-229.
- Meisel H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Inc Biopoly.* 1997;43:119-128.
- Teschemacher H, Koch G, Brantl V. Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopoly.* 1997;43:99-117.
- Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Okubo A, Yamazaki S, Takano T. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J Dairy Sci.* 1995;78:777-783.
- Maeno M, Yamamoto N, Takano T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci.* 1996;79:1316-1321.
- Mullally MM, Meisel H, FitzGerald RJ. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *Int Dairy J.* 1997;7:299-303.
- Pihlanto-Leppälä A, Rokka T, Korhonen H. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *Int Dairy J.* 1998;8:325-331.
- Heddleson RA, Park O, Allen JC. Immunogenicity of casein phosphopeptides derived from tryptic hydrolysis of  $\beta$ -casein. *J Dairy Sci.* 1997;80:1971-1976.
- FitzGerald RJ. Potential uses of caseinophosphopeptides. *Int Dairy J.* 1998;8:451-457
- Sánchez L, Peiró JM, Castillo H, Pérez MD, and Ena JM. Kinetics parameters for desnaturation of bovine milk lactoferrin. *J Food Sci.* 1992;57:873-879.
- Belem MAF, Gibbs BF, Lee HB. Proposing sequences for peptides derived from whey fermentation with potential bioactive sites. *J Dairy Sci.* 1999;82:486-493.
- Wakabayashi H, Bellamy W, Takase M, Tomita M. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by lactoferricin, a potent antimicrobial peptide derived from cow's milk. *J Food Prot.* 1992;55:238-240.

33. Dionysium DA, Milne JM. Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization. *J Dairy Sci.* 1998;80:667-674
34. Gouldsworthy AM, Leaver J, Banks JM. Application of mass spectrometry sequencing technique for identifying peptides present in cheddar cheese. *Int Dairy J.* 1996;6:781-790.
35. Martínez-Cuesta MC, Fernández PP, Requena T, Peláez C. Enzymatic ability of *Lactobacillus casei subsp. casei* IFPL731 for flavour development in cheese. *Int Dairy J.* 2001;11:577-585.
36. Lynch CM, McSweeney PLH, Fox PF, Cogan TM, Drinan FD. Manufacture of cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. *Int Dairy J.* 1996;6:851-867.
37. Fox PF, McSweeney PLH. Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening. In: *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk.* Law BA, editors. London, UK: Blackie Academic & Professional; 1997. p.1-49.
38. Visser S. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. *J Dairy Sci.* 1993;76:329-350.
39. Gómez MJ, Rodríguez E, Gaya P, Nuñez M, Medina M. Characteristics of manchego cheese manufactured from raw and pasteurized ovine milk and with defined-strain or commercial mixed-strain starter cultures. *J Dairy Sci.* 1999;82:2300-2307.
40. Ryhänen EL, Pihlanto-Leppälä A, Pahkala E. A new type of ripened low-fat cheese with bioactive properties. *Int Dairy J.* 2001;11:441-447.
41. Matar C, Amiot J, Savoie L, Goulet J. The effect of milk fermentation by *Lactobacillus helveticus* on the release of peptides during in vitro digestion. *J Dairy Sci.* 1996;79:971-979.
42. Perdígón G, Vintiñi E, Alvarez S, Medina M, Medici M. Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. 1998;82:1108-1114.
43. LeBlanc JG, Matar C, Valdéz JC, LeBlanc J, Perdígón G. Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. *J Dairy Sci.* 2001;85:2733-2742.
44. Vinderola CG, Prosello W, Reinheimer JA. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and Nonprobiotic Microflora in Argentinian Fresco Cheese. *J Dairy Sci.* 2000;83:1905-1911.
45. Law J, Haandrikman A. Review article: Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int Dairy J.* 1997;7:1-11.
46. Haileselassie SS, Lee BH, Gibbs B. Purification and identification of potentially bioactive peptides from enzyme-modified cheese. *J Dairy Sci.* 1999;83:1612-1617.
47. Yamamoto N, Maeno M, Takano T. Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *J Dairy Sci.* 1999;82:1388-1393.
48. Leclerc PL, Gauthier SF, Bachelard H, Santure M, Roy D. Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *Int Dairy J.* 2002;12:995-1004.
49. Laffineur E, Genetet N, Leonil J. Immunomodulatory activity of beta-casein permeate medium fermented by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci.* 1996;79:2112-2120
50. Hernández-Ledesma B, Recio B, Ramos M, Amigo L. Preparation of ovine and caprine  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *Int. Dairy J.* 2002;12:805-812.
51. Abubaker 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;81:3131-3138.
52. Shah NP. Effects of milk-derived bioactives: an overview. *Br J Nutr.* 2000;84(Suppl. 1):S3-S10.
53. Baró L, Jiménez J, Martínez-Férez A, Bouza JJ. Review articles: Bioactive milk peptides and proteins. *Ars Pharmaceutica.* 2001;42:135-145
54. Gagnaire V, Mollé D, Herrouin M, Léonil J. Peptides identified during Emmental cheese ripening: origin and proteolytic systems involved. *J Agric Food Chem.* 2001;49:4402-4413.
55. Dziuba J, Minkiewicz P, Nalecz D, Iwaniak A. Database of biologically active peptide sequences. *Nahrung-Food* 1999;43:190-195.
56. Kvasnicka F. Proteomic: general strategies and application to nutritionally relevant proteins. *J Chromatography B.* 2002;77:3-13
57. Soest RV, Schwart H, Mitulovic G, Swart R, Dragan I, Chervet JP. Dual-gradient capillary LC/MS/MS for complex proteomics analysis. LC Packings - A Dionex Company, Sunnyvale, CA, USA. 2003.
58. Yanagida M. Functional proteomics: current achievements. *J Chromatography B.* 2002;771:89-106.

Recibido: 20-01-2005

Aceptado: 06-07-2005