



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“RELEVANCIA DE ALGUNOS PÉPTIDOS
BIOACTIVOS PRESENTES EN EL SUERO DE
LECHE”**

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

YAZÚ ITZEL ROMERO MORALES



Ciudad universitaria, CD. MX., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: SANDRA PÉREZ MUNGUÍA.
VOCAL: GABRIELA ALATORRE GARCÍA.
SECRETARIO: VERÓNICA GARCÍA SATURNINO.
1er. SUPLENTE: EVA PATRICIA BERMÚDEZ GARCÍA.
2° SUPLENTE: ZAIRA BERENICE GUADARRAMA ÁLVAREZ.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 4C, EDIFICIO A. FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

M. EN C. VERÓNICA GARCÍA SATURNINO

SUSTENTANTE:

YAZÚ ITZEL ROMERO MORALES

ÍNDICE

OBJETIVOS	4
INTRODUCCIÓN.....	5
ANTECEDENTES	6
1. LECHE	6
2. SUERO.....	7
2.1. SUERO DE MANTEQUILLA.....	7
2.2. SUERO DE QUESO	12
2.3. PROBLEMÁTICA DEL SUERO DE LECHE COMO COMPONENTE DE DESECHO.....	18
2.4. USOS DEL SUERO DE LECHE	22
2.4.1. PRODUCTOS OBTENIDOS A PARTIR DEL PROCESAMIENTO FÍSICO-QUÍMICO	23
2.4.2. PRODUCTOS OBTENIDOS A PARTIR DEL PROCESAMIENTO BIOTECNOLÓGICO ..	24
3. GENERACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS	26
3.1. PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE LAS PROTEÍNAS DEL SUERO DE LECHE	28
3.1.1. PÉPTIDOS BIOACTIVOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	36
3.1.2. PÉPTIDOS BIOACTIVOS CON ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA.....	44
3.1.3. PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	51
3.1.4. PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD OPIOIDE	57
3.2. PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE LA CASEÍNA	63
4. APLICACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS DEL SUERO DE LECHE.....	64
5. CONCLUSIONES.....	70
6. BIBLIOGRAFÍA.....	71

OBJETIVOS

Objetivo general:

Generar un documento que compile información actualizada sobre los péptidos bioactivos con actividad antioxidante, antihipertensiva, antimicrobiana y opioide presentes en el suero de leche.

Objetivos particulares:

- Identificar los principales usos que se le dan al suero de leche, enfatizando el uso de las proteínas presentes en el.
- Analizar los estudios realizados sobre los diferentes tipos de péptidos bioactivos del suero de leche para conocer su proceso de identificación.
- Investigar las aplicaciones actuales de los péptidos bioactivos del suero de leche y su posible aplicación como ingredientes en la generación de productos funcionales.

INTRODUCCIÓN

La leche es uno de los alimentos más completos que existe en la naturaleza por su alto valor nutritivo y debido a su composición química (O'Mahony y Fox, 2014). Siendo sus principales componentes: agua, materia grasa, proteínas, carbohidratos (lactosa) y sales. La composición de la leche determina su calidad nutritiva, su valor como materia prima y muchas de sus propiedades (Pereira, 2014).

En la industria láctea, en el proceso de elaboración de mantequilla y queso, se obtiene un subproducto llamado suero, con una producción mundial estimada de entre 180 a 190 millones de toneladas al año (Yadav *et al.*, 2015), de las cuales, el suero obtenido en la elaboración del queso, también llamado suero de queso, suero de leche, suero lácteo o lactosuero, contribuye en un 95% (Macwan *et al.*, 2016). El suero de leche es considerado un agente contaminante ya que solo la mitad es tratado y transformado en productos de valor agregado. En México, el 47% del suero de leche producido es descargado al drenaje, llegando a ríos y suelos, causando serios problemas de contaminación (Comisión Nacional del Agua, 2017) y una pérdida significativa de nutrientes (Chacón-Gurrola *et al.*, 2017; Belén *et al.*, 2018).

Lo anterior se debe en gran medida al desconocimiento de los beneficios nutricionales de este subproducto y a la dificultad para acceder a las tecnologías apropiadas para su manejo y procesamiento (Poveda, 2013).

Uno de los componentes mayoritarios del suero de leche son las proteínas, por lo que sus propiedades fisicoquímicas y funcionales pueden ser utilizadas de mejor manera. Particularmente, su importancia radica en su funcionalidad, asociada principalmente a los péptidos bioactivos codificados dentro de su secuencia primaria, con aplicaciones en la salud humana y en la tecnología de los alimentos, por su actividad antioxidante, antihipertensiva, antimicrobiana y opioide, entre otras.

ANTECEDENTES

1. LECHE

La leche es el fluido secretado de las glándulas mamarias de las hembras de todos los mamíferos. Contiene casi todos los nutrientes necesarios para sostener la vida. La humanidad ha utilizado como alimento principalmente la leche de la vaca, la cabra y la oveja, por lo que son las mejor caracterizadas (Fox *et al.*, 2015).

Para consumo humano la leche debe ser sometida a tratamientos térmicos u otros procesos que garanticen la inocuidad del producto; además puede ser sometida a operaciones tales como clarificación, homogeneización, estandarización u otras, siempre y cuando no contaminen al producto y cumpla con las especificaciones de su denominación (NOM-155-SCFI-2012).

La leche es un sistema biológico muy complejo en el que se presentan tres estados físicos de dispersión de sus múltiples constituyentes (Artica, 2014):

- a) Solución verdadera: compuesta por lactosa, sales, cationes, aniones, vitaminas hidrosolubles y proteínas del suero; conforman la fase acuosa.
- b) Dispersión coloidal: formada por micelas de caseína; conforman la fase coloidal.
- c) Emulsión: formada por sustancias liposolubles las cuales se encuentran como pequeños glóbulos de grasa insolubles en agua.

Cada uno de estos sistemas tiene una densidad diferente (1.05, 1.114 y 0.94 g/mL, respectivamente), pero se encuentran en equilibrio debido a mecanismos particulares de estabilidad. Estos sistemas pueden alterarse por los distintos tratamientos aplicados a la leche y sus derivados, provocando la inestabilidad de los productos lácteos (Badui, 2013).

2. SUERO

A partir de la leche, se obtiene una gran variedad de productos, entre ellos, la mantequilla y el queso. Durante su proceso de elaboración se genera un subproducto llamado suero. Al suero proveniente de la elaboración de mantequilla se le llama suero de mantequilla o mazada (Cais-Sokolińska y Rudzińska, 2018). Mientras que al suero proveniente de la elaboración de queso se le llama suero de queso, suero de leche, suero lácteo o lactosuero (Carvalho *et al.*, 2013).

2.1. SUERO DE MANTEQUILLA

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, se denomina mantequilla al “producto obtenido a partir de la grasa de la leche o grasa de la crema, la cual ha sido pasteurizada, sometida a maduración, fermentación o acidificación, batido o amasado, pudiendo ser o no adicionada de sal. El contenido de grasa butírica debe ser mínimo de 80%”.

La mantequilla es una emulsión de agua en aceite (16:84) que se obtiene por la inversión de fases de la crema de leche (emulsión de aceite en agua) y es estabilizada por las proteínas lácteas (Rønholt *et al.*, 2013; Rybak, 2016).

Las cuatro etapas básicas del proceso de elaboración de mantequilla son:

1. Concentración de la grasa de la leche.
2. Cristalización de la fase grasa de la leche.
3. Desestabilización de la emulsión de grasa en agua.
4. Obtención de una emulsión de agua en grasa.

En la Figura 1, se muestran los pasos para la elaboración de la mantequilla que serán explicados más adelante.

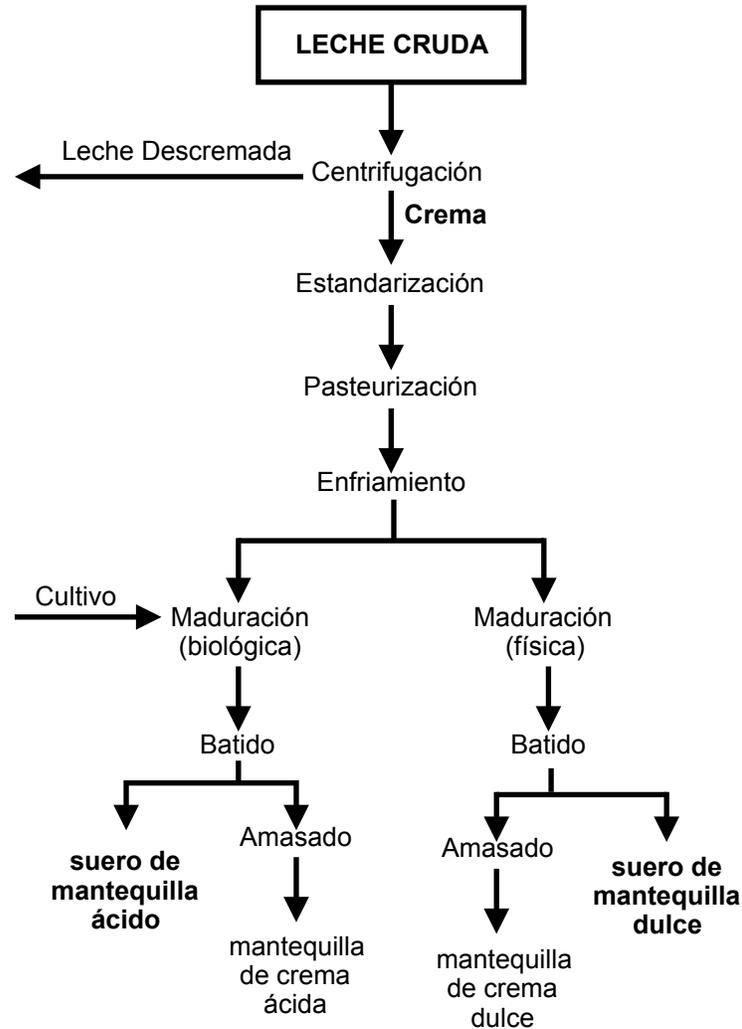


Figura 1. Proceso de elaboración de la mantequilla.

(Figura basada en información de Belitz *et al.*, 2009; Rønholt *et al.*, 2013; Rybak, 2016)

La leche fresca se centrifuga para obtener la crema, que es estandarizada a un contenido de grasa del 35% al 42% (Fox *et al.*, 2015).

La crema estandarizada se pasteuriza a 85 °C por 15 s. La crema pasteurizada se enfría durante aproximadamente 3 h para inducir la cristalización de la grasa en los glóbulos de grasa y, además, para obtener el mayor rendimiento en el batido (Badui, 2013; Fox *et al.*, 2015).

Después del enfriamiento, se pueden obtener dos tipos de mantequilla: la mantequilla de crema ácida y la mantequilla de crema dulce. La principal diferencia entre ambas es que en la primera hay una maduración biológica, donde se requiere de la adición de un cultivo iniciador, mientras que en la segunda hay una maduración física (Conway *et al.*, 2014).

En el caso de la mantequilla de crema ácida, la maduración y la acidificación son los pasos más importantes en su producción. El proceso se realiza en una maduradora de crema o cuba, con un adecuado mezclado y control de temperatura (de 8 a 19) °C. El cultivo iniciador se adiciona a la crema seguido de una incubación durante 12 h a 24 h que genera la acidez requerida y descenso del pH (5.0 - 4.6). El cultivo iniciador consiste en varias cepas de bacterias ácido lácticas (principalmente *Lactococcus lactis* subsp., *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp., *cremoris* y *Lactococcus lactis* subsp., *diacetylactis*) (Bodnarchuk *et al.*, 2015).

En cuanto a la producción de mantequilla de crema dulce, la maduración física consiste en una cristalización. La formación de cristales de grasa depende del control de temperatura durante el proceso de maduración de la crema. En consecuencia, la textura de la mantequilla puede ser modificada (Rønholt *et al.*, 2013; Rybak, 2016; Lee y Martini, 2018).

La maduración física se puede realizar a 5 °C por 48 h ó con otro método, en el que la crema no se mantiene en una temperatura fija. El principio de este método es que al someter la crema a una temperatura por debajo del punto de fusión de la fracción grasa provoca su sobreenfriamiento, y las moléculas comienzan a agregarse en pequeños grupos (o núcleos), que se forman y disuelven continuamente hasta alcanzar un tamaño crítico del cristal. En un segundo paso, la crema se calienta, esto hace que una fracción de los ácidos grasos llegue a su punto de fusión y posteriormente se recristalicen durante el tercer paso, donde se aplica una temperatura de enfriamiento, dando como resultado una mezcla de triacilglicéridos cristalinos de alto y bajo punto de fusión (Rønholt *et al.*, 2013; Rybak, 2016; Lee y Martini, 2018).

En el batido, como la grasa de la leche se encuentra en forma de glóbulos grasos, al batir la crema hay tanto incorporación de aire como colisiones físicas repetitivas. Por lo tanto, la membrana que cubre al glóbulo de grasa se rompe. En consecuencia, se separan dos fases: la fase acuosa (suero de mantequilla) y la fase grasa (mantequilla), produciendo una inversión de la emulsión que al final formará una fase sólida de la que el suero se separa por drenado (Cheung, 2015).

Al separarse la fase acuosa de la fase grasa, las fracciones desintegradas de la membrana del glóbulo graso (los lípidos polares y las proteínas de membrana) permanecen en el suero. Alrededor del 19% de las proteínas que forman la membrana se quedan en la fase acuosa (Vanderghem *et al.*, 2010). Además, el batido permite que las gotas de agua (de diámetro de 2.3 μm a 10.6 μm) retenidas por la fase grasa queden finamente distribuidas. Posteriormente, el suero de mantequilla se separa y la mantequilla se lava si es necesario (Rybak, 2016).

Finalmente, el amasado se realiza principalmente para reducir el contenido de aire de la mantequilla y en este también se puede añadir la sal, obteniendo así la mantequilla con características típicas (Badui, 2013).

En resumen, el suero es el subproducto líquido que se obtiene al batir la crema en la fabricación de mantequilla. Los fragmentos de la membrana del glóbulo de grasa de la leche (constituida principalmente por proteínas, minerales y fosfolípidos) terminan en el suero junto con la mayoría de los componentes de la crema solubles en agua, como la lactosa, los minerales y las proteínas de la leche. Mientras que los triacilglicéridos del núcleo adiposo interno del glóbulo graso forman la fase de la mantequilla (Conway *et al.*, 2010; Holzmüller y Kulozik, 2016).

El suero es conocido por su alta concentración de lípidos polares de la membrana del glóbulo de grasa de la leche. El contenido de fosfolípidos es cuatro a siete veces mayor en el suero que en la leche entera y está constituido por fosfatidilcolina, esfingomiélin, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina y glucosilceramida.

El 80% de las proteínas presentes en el suero de mantequilla son caseínas y proteínas del suero, el 20% restante son proteínas de origen de membrana del glóbulo graso (Conway *et al.*, 2014).

Existen dos tipos de suero de mantequilla según sea la crema utilizada en su proceso de elaboración, los cuales son:

- a) Suero de mantequilla ácido: obtenido a partir de crema fermentada por bacterias ácido lácticas. Estas bacterias son responsables del aroma característico de la mantequilla.
- b) Suero de mantequilla dulce: es el suero obtenido mediante el batido de crema dulce, sin fermentar, ni adición de cultivos lácticos.

La composición entre el suero de mantequilla dulce y el suero de mantequilla ácido difiere en la cantidad de lactosa, lípidos y pH (Cuadro 1). El suero de mantequilla ácido tiene menor cantidad de lactosa, debido a la fermentación realizada por las bacterias ácido lácticas, mayor cantidad de lípidos, la cual depende de la eficiencia del batido realizado y, menor pH, debido a la producción de ácido láctico durante la maduración biológica (Conway *et al.*, 2014).

Cuadro 1. Composición del suero de mantequilla dulce y ácido		
<i>Componentes</i>	<i>Suero de mantequilla dulce (%)</i>	<i>Suero de mantequilla ácido (%)</i>
Proteínas	3.4	3.4
Cenizas	0.8	0.8
Lactosa	4.8 - 5.3	4.3
Lípidos	5.7 - 13.1	22.3
Fosfolípidos	1.2 - 1.3	1.1
pH	6.4 - 6.6	5.4

(Información basada de Cheung, 2015; Holzmüller y Kulozik, 2016; Lambert *et al.*, 2016)

2.2. SUERO DE QUESO

El queso es el producto obtenido de la precipitación de las caseínas, el cual deja como residuo el llamado suero de la leche. La precipitación se puede realizar por medio de dos métodos: con la adición de renina o cuajo, o bien, acidificando hasta alcanzar el punto isoeléctrico de las caseínas (pH 4.6) (Badui, 2013).

La Norma Oficial Mexicana NOM-223-SCFI/SAGARPA-2018 define al queso como “el producto blando, semiduro, duro y extraduro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche”, obtenido mediante:

- a) Coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche descremada, leche parcialmente descremada, crema, mantequilla, o de cualquier combinación de estos productos, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación, respetando el principio de que la elaboración del queso resulta en una concentración de proteína láctea (especialmente la porción de caseína) y que por consiguiente, el contenido de proteína del queso debe ser más alto que el de la mezcla de los productos lácteos ya mencionados en base a la cual se elaboró el queso, y/o
- b) Técnicas de elaboración que conducen a la coagulación de la proteína de la leche y/o productos obtenidos de la leche que dan un producto final que posee las mismas características físicas, químicas y organolépticas que el producto definido en el inciso anterior.

Los pasos fundamentales para su elaboración son: coagulación de la leche, cortado de la cuajada, eliminación del suero, salado, prensado y maduración (si se requiere) (Badui, 2013).

Existen aproximadamente 2 000 variedades de queso, generalmente producidas a

partir de leche pasteurizada. En algunos casos, se opta por no homogeneizar la leche (Figura 2). Esto se debe a que en la homogeneización hay una reducción en el tamaño de los glóbulos de grasa que provoca un aumento en su área superficial, dando como resultado que, durante el cuajado, la red proteínica formada (con los glóbulos de grasa ocluidos) sea más débil, haciendo que el coágulo formado sea más blando, poroso y permeable (Fox *et al.*, 2015).

El proceso inicia con la obtención de la leche. A partir de que la vaca es ordeñada, la leche cruda se mantiene en refrigeración hasta ser procesada, esto incluye su transporte. Se mantiene en tanques o silos a temperaturas inferiores a 4 °C, siendo 5 °C la temperatura crítica ya que, a temperaturas superiores, las bacterias que la contaminan crecen rápidamente (Belitz *et al.*, 2009).

Una vez que la leche es recibida en la industria, se somete a una purificación por los sólidos que pueda tener (impurezas), esta purificación se realiza mediante una centrifugación.

La leche higienizada se pasteuriza aplicando el tratamiento lento por lotes (65 °C, 30 min) o de forma continua (72 °C, 15 s) (Ritota *et al.*, 2017).

La estandarización es el ajuste de la relación caseína/grasa de la leche de quesería que depende del tipo de queso a fabricar. Se basa en la adición de leche descremada, la eliminación de grasa (descremado de la leche a cuajar) y el control del contenido de caseína por ultrafiltración (Soodam y Guinee, 2018).

Después se añaden aditivos, estos incluyen: sales de calcio que mejoran la coagulación de las proteínas y la textura del queso; nitratos para inhibir la germinación de esporas. La leche estandarizada se mezcla en un tanque con un cultivo iniciador (son principalmente bacterias ácido lácticas pero también se agregan cultivos de otros microorganismos específicos) de 18 °C a 50 °C, y su composición depende del tipo de queso a fabricar. Como resultado aumenta la acidez de la leche principalmente por la producción de ácido láctico y reducción del pH a 5.5 - 5.3. Además, se busca obtener

textura, sabor y aroma, lo cual se logra con las enzimas de dichos cultivos iniciadores, las cuales provocan la degradación de diversos componentes de la leche (Belitz *et al.*, 2009).

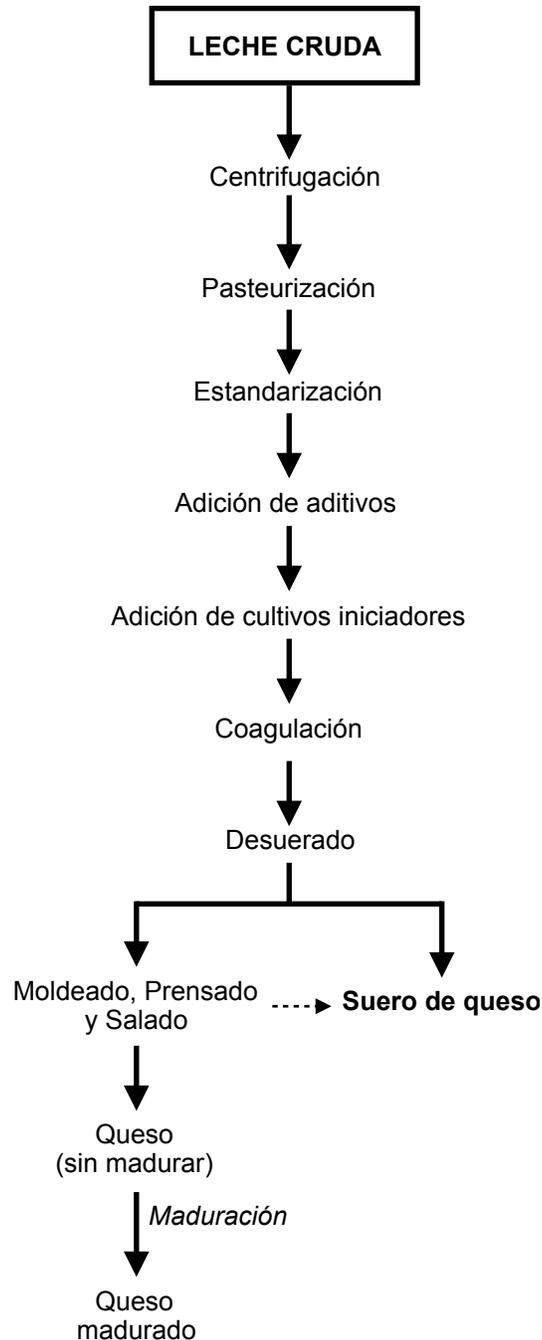


Figura 2. Proceso de elaboración de los quesos.

(Figura basada en información de Belitz *et al.*, 2009; Prazeres *et al.*, 2012; Fox *et al.*, 2015)

La leche coagula generando una masa suave y semisólida. La coagulación se lleva a cabo por:

- a) Acidificación: por cultivos iniciadores (pH 4.5-4.6), o por la adición de ácidos orgánicos o minerales. La acidificación se realiza a una temperatura de 20 °C a 40 °C, al disminuir el pH se alcanza el punto isoeléctrico de las caseínas; en este punto, la carga neta de las proteínas es igual a cero, lo cual produce que la micela de caseína se desestabilice y precipite, dejando en solución las proteínas del suero (Hernández-Rojas y Vélez-Ruíz, 2014; Soodam y Guinee, 2018). Además, el calcio coloidal contenido en las micelas de caseína se solubiliza y se reparte en el suero (Carvalho *et al.*, 2013).
- b) Coagulación enzimática: por la adición de enzimas proteolíticas o renina (también llamada cuajo, complejo enzimático que contiene quimosina) o bien, otro cuajo (proteinasas seleccionadas) que puede ser de origen microbiano, cuya actividad enzimática durante 30 min provoca la coagulación de la leche mediante un fenómeno que se efectúa en dos pasos: primero la hidrólisis del enlace peptídico Met₁₀₅-Phe₁₀₆ de kappa caseína (κ -CN) generando dos péptidos: para- κ -caseína y el macropéptido, que trae consigo la pérdida del sistema de estabilización de las caseínas, y posteriormente, la coagulación de las caseínas sensibles al calcio: α -CN y β -CN (Badui, 2013; Hernández-Rojas y Vélez-Ruíz, 2014; Yadav *et al.*, 2015).
- c) Combinación de las dos anteriores.

En el desuerado (sinéresis), la cuajada formada (gel de proteína) se corta en cubos para deshidratarla, esta se mantiene en agitación para favorecer la eliminación del suero. Los cubos son de tamaño variable, dependiendo del queso deseado; mientras más pequeños, mayor será el desuerado. El resultado es una cuajada rodeada del suero (Ramírez-López y Vélez-Ruiz, 2012).

Después, el suero es drenado y se clasifica como suero dulce o suero ácido, lo cual será explicado más adelante.

El moldeado, prensado y salado son importantes para obtener ciertas características de la variedad de queso deseada. En el caso del moldeado, la cuajada se coloca en moldes para drenar el suero restante y así formar una masa continua. El prensado se aplica a ciertas variedades de queso para alcanzar la humedad deseada y si es necesario se aplica temperatura. Por otro lado, en el salado, el añadir sal influye en una serie de papeles importantes en el queso: es el principal factor que afecta la actividad del agua y tiene un efecto importante sobre el crecimiento y la supervivencia de las bacterias y la actividad de las enzimas en el queso; promueve la sinéresis y por lo tanto reduce el contenido de humedad del queso y contribuye al sabor (Ramírez-López y Vélez-Ruiz, 2012).

Una vez llevados a cabo los procedimientos descritos, se obtiene un queso no madurado (con las características específicas de la variedad).

Para la obtención de quesos madurados, la maduración incluye todos los cambios químicos que ocurren en el queso, algunos de los cuales comienzan antes de que finalice la fabricación de la cuajada. La estructura y composición del queso cambian y, por lo tanto, sus propiedades organolépticas. Se involucran aspectos bioquímicos y microbiológicos, así como puramente químicos y físicos. El desarrollo de las propiedades del queso, como la textura, la consistencia, el aroma y el sabor, son especialmente atribuibles a la conversión de la lactosa, proteína, grasa y, en algunos quesos, citrato. Depende de la composición del queso, en particular del contenido de agua, la microflora y las condiciones externas, como la temperatura y la humedad en las salas de maduración (Khattab *et al.*, 2019).

El suero de queso, suero de leche o lactosuero es un subproducto natural del proceso de elaboración del queso. Es definido como la sustancia líquida obtenida por separación del coágulo de leche en la elaboración del queso. Es un líquido translúcido amarillo verdoso obtenido de la leche después de la precipitación de la caseína (Prazeres *et al.*, 2012; Yadav *et al.*, 2015). En el suero se encuentran suspendidos los componentes que no fueron integrados durante la coagulación de la caseína: partículas

suspendidas solubles y no solubles (proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales), y compuestos de importancia biológica-funcional (Poveda, 2013).

En términos generales, a partir de 10 L de leche de vaca se puede producir 1 kg de queso y de 8 a 9 kg de suero (Prazeres *et al.*, 2012; Dullius *et al.*, 2018). El suero obtenido puede ser de dos tipos: suero dulce y suero ácido (Paredes *et al.*, 2015):

- a) El suero dulce es el que se produce a partir de la coagulación enzimática, tiene un pH más elevado, mayor contenido de sólidos totales, lactosa y menor cantidad de calcio y fósforo. Se obtiene al elaborar quesos como el Chihuahua, Cheddar, Manchego, entre otros.
- b) El suero ácido es el que se obtiene a partir de la acidificación, ya sea por cultivos iniciadores, ácidos de grado alimentario y/o acidógenos. Tiene un pH más bajo y se obtiene al elaborar quesos como el blanco y cottage.

Ambos sueros presentan diferencias en su composición (Cuadro 2) que varía dependiendo de las características de la leche utilizada, el tipo de queso producido y del proceso de tecnología empleado en la elaboración del queso (Poveda, 2013).

Cuadro 2. Composición de los sueros de queso dulce y ácido		
Componentes	Suero dulce (%)	Suero ácido (%)
Sólidos totales	6 - 7	5.2 - 6.2
Lactosa	4.6 - 5.2	4.3 - 4.7
Proteína	0.6 - 1	0.6 - 0.8
Lípidos	0.3 - 0.5	0.3 - 0.5
Lactato	0.1 - 0.2	0.6 - 0.7
Cenizas	0.5	0.8
Calcio	0.04 - 0.06	0.12 - 0.16
Fosfatos	0.1 - 0.3	0.2 - 0.45
Cloruros	0.11	0.11
pH	5.9 - 6.4	4.6 - 4.7

(Cuadro basado en información de Belitz *et al.*, 2009; Badui, 2013; Hernández-Rojas y Vélez-Ruiz, 2014; Yadav *et al.*, 2015; Bansal y Bhandari, 2016)

La principal diferencia, entre ambos tipos de suero, es el contenido de minerales y la acidez (Yadav *et al.*, 2015).

2.3. PROBLEMÁTICA DEL SUERO DE LECHE COMO COMPONENTE DE DESECHO

La industria alimentaria es uno de los sectores económicos con mayores problemáticas de impacto ambiental a nivel mundial, debido a que produce residuos con altas cargas de materia orgánica (Guerrero-Rodríguez *et al.*, 2012). De acuerdo con sus necesidades de producción, cada industria genera residuos diferentes. Destaca la industria láctea como la tercera actividad más importante dentro de la rama de la industria alimentaria. Esta genera principalmente residuos líquidos y la descarga de estos desechos sin un tratamiento previo se convierte en una fuente de contaminación (Belén *et al.*, 2018).

Dentro de la industria láctea se produce el suero como subproducto, tanto de la mantequilla como de queso, con una producción mundial estimada de entre 180 a 190 millones de toneladas al año, de las cuales el suero de queso contribuye en un 95% (Yadav *et al.*, 2015; Macwan *et al.*, 2016).

Como ya se mencionó, a partir de 10 L de leche de vaca se pueden producir de 8 a 9 kg de suero, dando como resultado, una producción mundial de suero que se estima de 171-181 millones de toneladas anuales (Yadav *et al.*, 2015). Comparando las cifras, el suero de mantequilla queda en segundo plano respecto a la producción anual de suero y es por esto que para fines de este documento se hará énfasis en el suero de queso, con el término “suero de leche”.

Un aspecto problemático del suero es su volumen creciente como producto secundario, que se convirtió en perjudicial para el medio ambiente con la industrialización y expansión de la fabricación de productos lácteos en el siglo XX (Smithers, 2015; Dullius *et al.*, 2018).

El suero de leche, contiene aproximadamente el 93% del agua presente en la leche y retiene el 55% de los nutrientes originales de la misma (el 95% de lactosa, el 25% de las proteínas solubles, el 8% de la materia grasa de la leche y sales minerales). A pesar de su contenido de nutrientes y de otros componentes como el ácido cítrico, compuestos nitrogenados no proteínicos (urea y ácido úrico), vitaminas, etc., solo la mitad del suero de leche producido mundialmente es tratado y transformado en productos de valor agregado, mientras que el restante se ha considerado como un desecho, el cual se descarga en ríos, lagos y otros centros de aguas residuales, o en el suelo, lo que representa una pérdida significativa de nutrientes, ocasionando serios problemas ambientales y de contaminación (Chacón-Gurrola *et al.*, 2017; Belén *et al.*, 2018).

La eliminación del suero se debe, entre otros aspectos, al desconocimiento de algunos productores sobre las bondades nutricionales de este subproducto y a la dificultad para acceder a las tecnologías apropiadas para su manejo y procesamiento; también, a la falta de una regulación que limite o prohíba su descarga como efluente sin tratamiento previo ó, a lo poco estrictas que son las ya existentes. Como ya se mencionó, el desechar el suero de leche afecta tanto al agua como al suelo. En el caso del suelo, modifica sus características fisicoquímicas, disminuyendo los rendimientos de los cultivos. Además, se ha observado que el nitrógeno del suero de leche es arrastrado a través de diversas capas llegando hasta los mantos freáticos como nitrato, siendo un contaminante móvil y permanente, ya que no es adsorbido por los materiales del acuífero y no precipita, convirtiéndose en un peligro para la salud de los animales y humanos, ya que esta agua es utilizada principalmente para consumo humano y riego agrícola (Poveda, 2013; Yadav *et al.*, 2015).

Para evaluar la calidad del agua se utilizan los indicadores DBO (demanda bioquímica de oxígeno) y DQO (demanda química de oxígeno). Estos indicadores determinan la cantidad de materia orgánica presente en los cuerpos de agua provenientes principalmente de las descargas de aguas residuales municipal y no municipal. La DBO determina la cantidad de materia orgánica biodegradable y la DQO mide la cantidad total de materia orgánica. El incremento de la concentración de estos parámetros incide

en la disminución del contenido de oxígeno disuelto en el agua con la consecuente afectación de los ecosistemas acuáticos (Comisión Nacional del Agua, 2018). En el Cuadro 3, se observa la clasificación de los indicadores mencionados en México.

El ensayo DBO mide el oxígeno usado por los microorganismos en un periodo de incubación de 5 días a 20 °C para metabolizar la materia orgánica biodegradable. Se realiza durante este periodo de tiempo porque es lo que se tardan los microorganismos en oxidar la materia orgánica sin involucrar otros procesos que no forman parte de la biodegradación dando un resultado estable y reproducible (Norma Mexicana NMX-AA-028-SCFI-2001).

Cuadro 3. Clasificación Indicadores DBO y DQO en México (ríos, arroyos, lagos, lagunas, presas y zonas costeras)		
<i>Criterio a 5 días (mg/L)</i>	<i>Clasificación</i>	<i>Criterio (mg/L)</i>
DBO ≤ 3	Excelente (No contaminada)	DQO ≤ 10
3 < DBO ≤ 6	Buena Calidad (bajo contenido de materia orgánica biodegradable)	10 < DQO ≤ 20
6 < DBO ≤ 30	Aceptable (indicios de contaminación)	20 < DQO ≤ 40
30 < DBO ≤ 120	Contaminada	40 < DQO ≤ 200
DBO > 120	Fuertemente contaminada	DQO > 200

(Cuadro basado en información de la Comisión Nacional del Agua, 2018)

El suero de leche presenta un contenido elevado de lactosa y proteínas, que están asociadas con su alta DBO (Brandelli *et al.*, 2015) (principalmente la lactosa) aunque también forman parte de esta las trazas de grasa y sales que contiene (principalmente NaCl, KCl y sales de calcio) (Dullius *et al.*, 2018).

Aproximadamente el 99% de la materia orgánica del suero de leche es biodegradable,

lo que resulta en una DBO > 30,000 mg O₂/L para suero dulce y 35,000 mg O₂/L para suero ácido y una DQO > 60,000 mg O₂/L para suero dulce y ~80,000 mg O₂/L para suero ácido (Dullius *et al.*, 2018). Estos valores exceden significativamente a la clasificación “fuertemente contaminada” (Cuadro 3), lo cual hace evidente que no debe descargarse como efluente sin antes pasar por un tratamiento (Tirado-Armesto *et al.*, 2016).

El desechar suero de leche en el agua, incrementa la presencia de materia orgánica y agota el oxígeno disuelto, ya que es utilizado para metabolizarla, lo que dificulta la actividad biológica y reduce la vida acuática (Belén *et al.*, 2018); permite la reproducción de microorganismos produciendo cambios significativos en la DBO del agua contaminada; produce eutrofización (especialmente en lagos y ríos de movimiento lento), la cual se refiere al enriquecimiento excesivo de nutrientes, causando un crecimiento denso de vida vegetal y muerte de animales (Carvalho *et al.*, 2013); dificulta la biodegradabilidad y representa un riesgo importante para la vida acuática, para el medio ambiente y para la salud humana. Además, el desecho de suero en las alcantarillas municipales ha sido prohibido por muchas autoridades locales, ya que interrumpe el proceso biológico de las plantas de tratamiento de aguas residuales (Yadav *et al.*, 2015). Por lo tanto, el suero de leche no se puede descargar directamente sin un tratamiento y/o valorización adecuados.

Aunque en la mayoría de los países desarrollados se tratan las aguas residuales en un porcentaje elevado. Desafortunadamente en México sólo el 39.2% del agua recibe tratamiento y el 60.8% restante es agua contaminada que se vierte a nuestros lagos o lagunas y zonas costeras sin ningún tratamiento previo y, en cuanto al suero de leche, en México el 47% de este es descargado al drenaje y llega a ríos y suelos, causando un problema serio de contaminación (Comisión Nacional del Agua, 2017).

2.4. USOS DEL SUERO DE LECHE

Considerando las bondades nutricionales del suero de leche, debe considerarse como un recurso y no solo como un efluente de residuos, en vista de su potencial como fuente de productos de valor agregado. Es por esto que el suero de leche debe procesarse aún más para lograr beneficios máximos y limitar el impacto de la contaminación ambiental (Yadav *et al.*, 2015). Además, al reducir el volumen de este subproducto, se obtiene una reducción en los costos de operación (Belén *et al.*, 2018).

Los avances tecnológicos han permitido transformar el suero de leche en productos de valor agregado (Figura 3) por dos vías (Yadav *et al.*, 2015):

- a) La primera es el procesamiento directo (tratamiento físico-químico) para obtener: suero en polvo, concentrado de proteína de suero, aislado de proteína de suero, permeado de suero, lactosa y otras fracciones.
- b) La segunda involucra el procesamiento biotecnológico, donde el suero se utiliza como sustrato para diversos procesos microbianos/enzimáticos para obtener productos finales valiosos como: alimentos para animales, bioproteínas, probióticos, ácidos orgánicos, enzimas, carotenoides, bio-conservantes, gomas biológicas, exopolisacáridos y bioplásticos.

Las combinaciones de procesos biotecnológicos y fisicoquímicos son también aplicadas para producir productos de valor agregado (Yadav *et al.*, 2015).

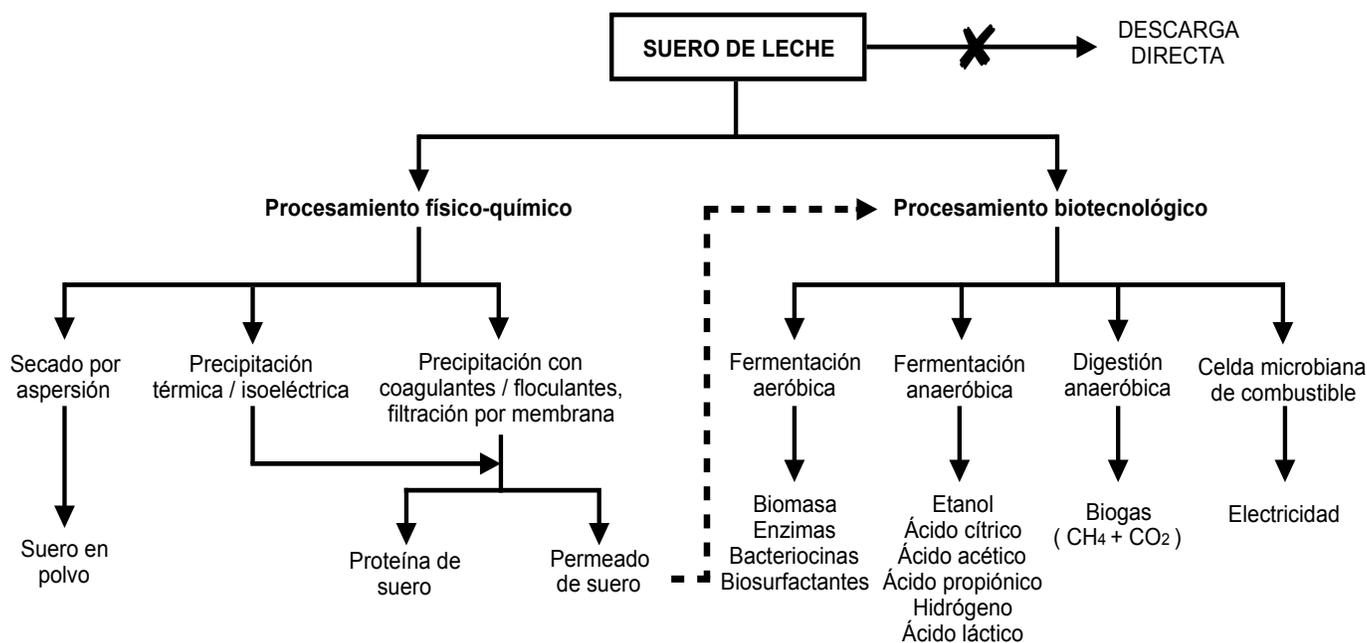


Figura 3. Procesos físico-químicos y biotecnológicos para la obtención de algunos productos industrialmente importantes a partir de suero de leche.

(Figura basada en información de Yadav *et al.*, 2015)

2.4.1. PRODUCTOS OBTENIDOS A PARTIR DEL PROCESAMIENTO FÍSICO-QUÍMICO

El producto de suero de leche más simple es el suero en polvo, que se obtiene al eliminar el agua mediante secado por aspersión (Yadav *et al.*, 2015). El concentrado de proteína se obtiene al eliminar las fracciones no proteínicas presentes en el suero (lípidos, lactosa, minerales y vitaminas) por medio de filtraciones por membrana, principalmente ultrafiltración. El contenido de proteína en los concentrados puede variar considerablemente, entre el 35% y el 85% (Hernández-Rojas y Vélez-Ruiz, 2014). Además, aunque estas tienen muchas aplicaciones en la industria alimentaria, las proteínas del suero también tienen usos no alimentarios, principalmente en cosméticos y productos farmacéuticos. Cabe resaltar que, durante este procesamiento, también se obtienen altos volúmenes de una corriente rica en lactosa, el permeado y como este sigue siendo un contaminante importante ya que retiene la lactosa (que es en gran parte responsable de la carga contaminante de suero) (Yadav *et al.*, 2015), es

posteriormente tratado, como se muestra en la Figura 3.

El aislado de proteína se obtiene mediante la eliminación de la fracción no proteínica para lograr concentraciones de proteína superiores al 90% en el producto final (Yadav *et al.*, 2015), bajos en grasa y en lactosa. El aislado de proteína de suero se somete a un procesamiento más fino, por lo que la proteína es más pura que la del concentrado.

En un proceso semejante a una pre-digestión de las proteínas (Hernández-Rojas y Vélez-Ruíz, 2014), los péptidos se pueden obtener a partir de la hidrólisis de concentrados o aislados de las proteínas del suero.

2.4.2. PRODUCTOS OBTENIDOS A PARTIR DEL PROCESAMIENTO BIOTECNOLÓGICO

Una amplia gama de productos de valor agregado se obtiene a partir de la fermentación de la lactosa del suero de leche y del permeado de suero. Sin embargo, en algunos casos, se requiere hidrolizar la lactosa vía enzimática empleando β -galactosidasa o mediante hidrólisis ácida antes de la fermentación (Yadav *et al.*, 2015).

En el caso del uso de la lactosa como un sustrato para la producción de compuestos valiosos por fermentación se encuentra la producción de etanol y de proteína unicelular. El etanol se produce a partir de la lactosa del suero de leche por *Kluyveromyces marxianus*; el etanol producido se puede usar como fuente de energía (como combustible) o también como sustrato para la producción de vinagre o ácido acético (Yadav *et al.*, 2015). La producción de proteína unicelular se realiza en bioprocesos también basados en levadura; en estos, el suero de leche se utiliza como fuente de carbono y energía para la producción de biomasa. La biomasa posee un alto contenido proteínico, por lo que recibe el nombre de proteína unicelular, refiriéndose a las células secas de este microorganismo. Las especies de levadura capaces de fermentar lactosa, además de la ya mencionada *Kluyveromyces marxianus*, son *Candida kefyr* y *Saccharomyces cerevisiae*, esta última requiere que la lactosa sea

hidrolizada previamente. Al obtener proteína unicelular, además de darle un valor agregado al suero de leche, disminuye el valor de DBO en un 70 - 80%, lo que convierte a este proceso en una opción adecuada para su tratamiento y la proteína unicelular obtenida se utiliza como aditivo e ingrediente alimentario (Belén *et al.*, 2018; Reihani y Khosravi-Darani, 2019).

Por otro lado, como se muestra en la Figura 3, los biotecnólogos han propuesto una gran cantidad de productos biológicos alternativos. Entre esos productos biológicos se encuentran ácidos orgánicos, polisacáridos, biogás (metano), aminoácidos, vitaminas, enzimas y otros compuestos.

Diferentes ácidos orgánicos como el ácido acético, el ácido propiónico, el ácido láctico y el ácido cítrico se pueden producir a partir de suero o permeado de suero por fermentación. La mayoría de los ácidos orgánicos se utilizan como productos químicos de especialidad ya sea para la producción de otro producto químico, materia prima, etc., (Yadav *et al.*, 2015).

La producción de polisacáridos se puede obtener a partir de diferentes fuentes, entre ellas está la lactosa hidrolizada a partir de permeado de suero de leche como un sustrato fermentable, otra es la goma xantana (un heteropolisacárido) producida por *Xanthomonas campestris*. También se usa la lactosa para la producción de otros exopolisacáridos como los dextranos (*Leuconostoc mesenteroides*), y biopolímeros como el poli- β -hidroxibutirato (PHB) (*Azotobacter chroococcum*) (Yadav *et al.*, 2015).

La digestión anaerobia de suero de leche da como resultado la producción de metano o biogás y es un proceso que consta de tres pasos sucesivos: hidrólisis de lactosa y proteína, fermentación (acidogénesis, acetogénesis) y metanogénesis. El metano producido puede usarse como fuente de energía (como combustible) o para generar electricidad (Yadav *et al.*, 2015).

Dentro de los productos restantes se encuentran los aminoácidos como el glutámico, lisina y treonina; vitaminas B₁₂ y B₂; enzimas como α -amilasa, β -galactosidasa, lipasa, penicilina acilasa y poligalacturonasa; otros compuestos como fructosa-difosfato, 2,3-

butanodiol, acetato de magnesio cálcico, lactato de amonio, butanol y glicerol (Guimarães *et al.*, 2010).

La materia orgánica presente en el suero se recupera como electricidad directa mediante su oxidación en una celda microbiana de combustible (Prazeres *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que estos productos y métodos utilizados son técnicamente alcanzables. Sin embargo, la investigación continúa haciendo que los productos de valor agregado sean aún más viables económicamente y los procesos de la industria se optimicen (Belén *et al.*, 2018).

Una vez mencionados todos estos productos de valor agregado, nos enfocaremos en aquellos que contienen principalmente proteínas, como lo son el suero en polvo, el concentrado de proteína y el aislado de proteína, los cuales pertenecen a la clasificación “productos obtenidos a partir del procesamiento físico-químico”, y son fuente de péptidos bioactivos.

3. GENERACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Las proteínas presentes en el suero de leche han sido reconocidas por sus diversas propiedades funcionales y valor nutricional, es por esto que los diferentes productos de valor agregado que las contienen (como el suero en polvo, el concentrado de proteína y el aislado de proteína) llegan a ser utilizados como ingredientes en la industria alimentaria y se siguen investigando nuevos métodos para desarrollar o transformar más productos (Dullius *et al.*, 2018).

Las propiedades funcionales de las proteínas del suero se deben principalmente a sus características físicas, químicas y estructurales, mientras que su valor nutricional está directamente relacionado con la concentración de aminoácidos esenciales (por su aporte de azufre) y aminoácidos de cadena ramificada (isoleucina, leucina y valina). Tienen la calidad nutricional más alta como fuentes de proteína en la dieta, incluso con un mayor valor biológico que la caseína (Baldasso *et al.*, 2011; Dullius *et al.*, 2018).

Por sus propiedades funcionales las proteínas del suero se emplean en diferentes áreas de la industria alimentaria (Yadav *et al.*, 2015):

- a) Los concentrados e hidrolizados se usan frecuentemente para mejorar propiedades funcionales como la calidad de horneado, el reemplazo de huevos, para mejorar el rendimiento en el queso, como estabilizador en yogurt y en salsas, como texturizante en productos para untar y como extensor en productos cárnicos.
- b) Las proteínas del suero se utilizan en panadería, confitería, carnes y mariscos para obtener un gel fuerte con una alta capacidad de retención de agua.
- c) Las interacciones entre proteínas dan como resultado la formación de un gel y forman una red elástica.
- d) Debido a su capacidad para estabilizar emulsiones en carnes procesadas y postres, las proteínas del suero también pueden usarse como espesantes o emulsionantes. Sus propiedades de emulsión dependen principalmente del pH y la emulsificación es más baja cerca del punto isoeléctrico.
- e) Las proteínas del suero inducen la formación de espuma al disminuir la tensión interfacial y exhiben sus mejores propiedades cerca del punto isoeléctrico, por lo que se utilizan en productos como coberturas batidas, pasteles, batidos y postres congelados, donde se busca esta propiedad.
- f) La fórmula de bebida fortificada con proteína de suero conocida como “ready-to-drink” (lista para beber) ha sido iniciada por el Consejo de Exportación de Productos Lácteos de Estados Unidos (USDEC, por sus siglas en inglés), proporciona proteínas nutricionales dirigidas especialmente a los atletas.

Por otro lado, sus propiedades nutricionales hacen que estas sean utilizadas como fuente de energía y aminoácidos esenciales (Hernández-Rojas y Vélez-Ruíz, 2014).

Además de sus propiedades funcionales y nutricionales como proteínas individuales, estas proteínas tienen bioactividades (las cuales serán revisadas más adelante) que están encriptadas dentro de su secuencia nativa (estructura primaria) y, por lo tanto,

pueden ser liberadas solamente por fragmentación de la proteína, dando como resultado péptidos bioactivos (Dullius *et al.*, 2018).

Los péptidos bioactivos o péptidos biológicamente activos, se definen como fragmentos específicos de proteínas, que tienen un impacto positivo en los seres humanos (Barac *et al.*, 2017), tienen el potencial de reducir el riesgo de enfermedades crónicas y, promover la salud (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011; Yadav *et al.*, 2015). Son fragmentos encriptados en las secuencias primarias de las proteínas, y que confieren funciones más allá de los beneficios nutricionales básicos (Li-Chan, 2015).

La actividad de un péptido bioactivo depende de su secuencia intrínseca de aminoácidos y de su tamaño (Yadav *et al.*, 2015). Son principalmente fragmentos que contienen de 2 a 20 aminoácidos (Barac *et al.*, 2017), los cuales se clasifican como: péptidos cortos (menos de 7 aminoácidos), péptidos de longitud moderada (de 7 a 25 aminoácidos) y péptidos grandes (más de 25 aminoácidos) (Dullius *et al.*, 2018).

La producción natural de estos péptidos bioactivos ocurre mediante la hidrólisis enzimática, que ocurre en la digestión gastrointestinal o, durante la fermentación o la maduración de quesos mediante enzimas de origen microbiano (Dullius *et al.*, 2018).

Otra forma de producir péptidos bioactivos es a través de la proteólisis enzimática *in vitro*, siendo esta la forma más común de producirlos (Dullius *et al.*, 2018).

3.1. PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE LAS PROTEÍNAS DEL SUERO DE LECHE

Las proteínas del suero representan aproximadamente el 20% de las proteínas totales de la leche. Esta fracción, aunque no es muy grande, representa una rica y variada mezcla de proteínas que poseen diferentes propiedades químicas, físicas y funcionales (Bansal y Bhandari, 2016).

Las proteínas del suero son una mezcla de diferentes proteínas individuales, que son β -lactoglobulina, α -lactalbúmina, inmunoglobulinas, albúmina de suero bovino,

lactoferrina, lactoperoxidasa, proteosa-peptona y glicomacropéptido (Cuadro 4). Excluyendo al glicomacropéptido, el cual se produce a partir de la caseína durante el primer paso del procesamiento enzimático del queso, todos los demás componentes proteínicos están presentes de forma natural en el suero (Yadav *et al.*, 2015).

Cuadro 4. Composición de proteínas y caracterización del suero de leche			
<i>Proteínas</i>	<i>Total de proteínas (% m/m)</i>	<i>Masa molecular (kDa)</i>	<i>Punto isoeléctrico (pH)</i>
β -lactoglobulina	40 - 50	18.3	5.35 - 5.49
α -lactalbúmina	12 - 20	14	4.2 - 4.5
glicomacropéptido	12	6.8	4.3 - 4.6
inmunoglobulinas	8 - 10	150 - 1000	5.5 - 8.3
albúmina de suero bovino	3 - 5	66	5.13
lactoferrina	1	76.5	9.5 - 10
lactoperoxidasa	0.5	78	9.5
proteosa-peptona	0.19	4 - 22	-

(Cuadro basado en información de Badui, 2013; Edwards y Jameson, 2014; Yadav *et al.*, 2015)

- β -LACTOGLOBULINA

La β -lactoglobulina es una proteína globular y es la más abundante del suero de leche. Su solubilidad depende del pH y la fuerza iónica. Se desnaturaliza y precipita a menos de 73 °C, su carga neta es negativa al pH de la leche y es la fracción proteínica que se ha estudiado con más detalle ya que ejerce una influencia decisiva en la estabilidad térmica de los productos lácteos (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011; Yadav *et al.*, 2015). La estructura cuaternaria de β -lactoglobulina depende del pH. Se presenta en forma de dímero al pH normal de la leche (Figura 4), el cual consta de 2 subunidades idénticas (Yadav *et al.*, 2015).

Es importante su aporte de aminoácidos esenciales (84 de sus 162 residuos de aminoácidos) (18 kDa). Al igual que otras proteínas globulares, sus aminoácidos hidrófilos y los ionizables se encuentran distribuidos de manera homogénea provocando que los apolares (tirosina, triptófano, leucina, fenilalanina, etcétera)

establezcan una alta hidrofobicidad en el centro de la molécula, por lo que es capaz de fijar y transportar colesterol y retinol (Hernández-Rojas y Vélez-Ruíz,; Yadav *et al.*, 2015).

La β -lactoglobulina no se encuentra en la leche materna y se considera como el principal alérgeno de la leche de vaca, es decir, la proteína más frecuentemente reconocida por la IgE humana. La antigenicidad de esta proteína se ha estudiado y sus epítomos (sitios reconocidos por el sistema inmunitario) están claramente identificados. Las estructuras inmunorreactivas se extienden ampliamente a lo largo de los 162 aminoácidos. Algunas de ellas son secuencias lineales cortas, mientras que otras son fragmentos grandes (Marengo *et al.*, 2016). Por esta razón, existen productos comerciales que imitan la leche humana con base en el suero de leche, al que se le ha eliminado esta proteína.

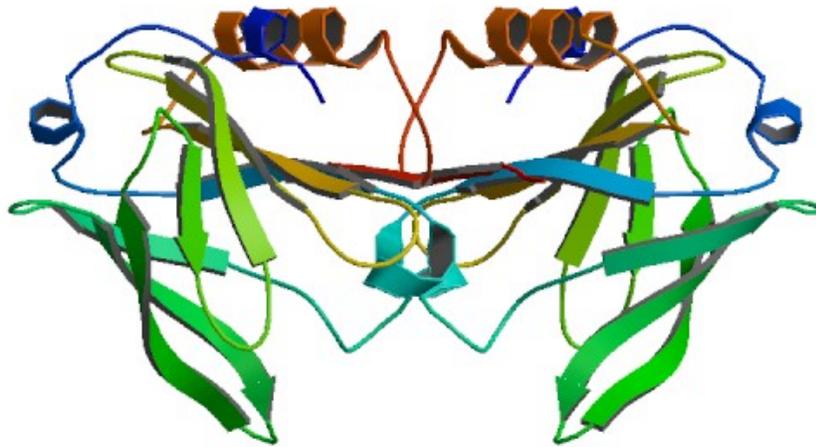


Figura 4. β -lactoglobulina.

(Figura tomada de *Protein Data Bank*)

- α -LACTALBÚMINA

La α -lactalbúmina es, por orden de importancia, la segunda proteína del suero, constituyendo del 12 - 20% del total de las proteínas del suero. Además, tiene actividad biológica, ya que desempeña una función importante en las células secretoras mamarias, siendo uno de los dos componentes de la lactosa sintetasa, enzima que

cataliza el paso final en la biosíntesis de la lactosa en la glándula mamaria (Chen *et al.*, 2017; Rao *et al.*, 2019).

Es una proteína globular y tiene una carga negativa neta al pH de la leche, presenta una alta afinidad por los iones metálicos, especialmente es sensible al calcio, presentando una gran afinidad por este y otros minerales como zinc, manganeso, cadmio, cobre y aluminio (Hernández-Rojas y Vélez-Ruíz, 2014). El calcio se une fuertemente a la α -lactalbúmina, y es estabilizado por siete enlaces de coordinación con los átomos de oxígeno (Figura 5) de los residuos Asp₈₂, Asp₈₄, Asp₈₇, Asp₈₈, Lys₇₉ y dos moléculas de agua (Edwards y Jameson, 2014). No tiene grupos sulfhidrilo libres, pero sí cuatro disulfuros, aportando 2.5 veces más azufre que las caseínas (Yadav *et al.*, 2015).

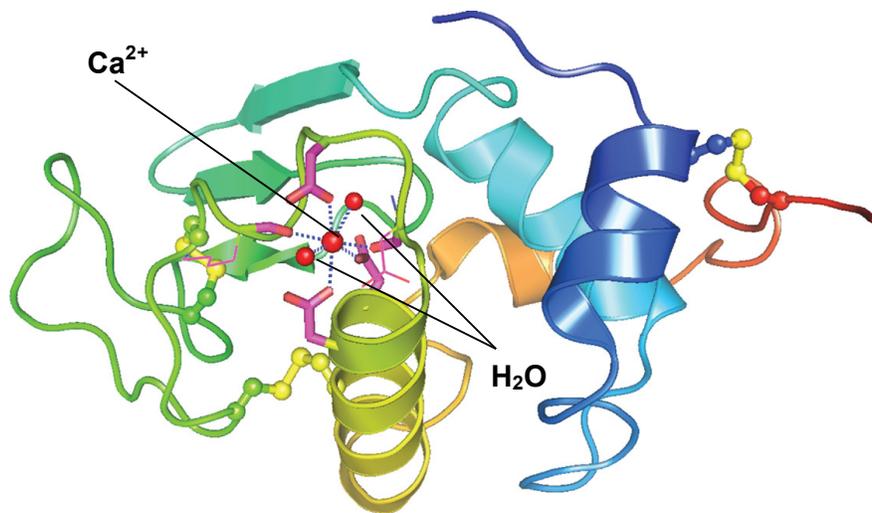


Figura 5. α -lactalbúmina.

(Figura adaptada de Edwards y Jameson, 2014)

Entre sus características más relevantes, se encuentra su bajo peso molecular, está formada por 123 residuos de aminoácidos, incluidos los aminoácidos de cadena ramificada y esenciales, tiene un alto contenido de triptófano y una secuencia de aminoácidos similar a la lisozima de la clara del huevo. Su estructura globular, de una sola cadena polipeptídica, contiene cuatro disulfuros y se desnaturaliza a 63 °C. Con

los enlaces disulfuro intactos, a medida que la proteína se produce en la leche, la estructura terciaria se despliega y repliega de forma reversible. La α -lactalbúmina no se desnaturaliza térmicamente de manera irreversible en la mayoría de las condiciones de procesamiento de la leche (Yadav *et al.*, 2015).

- GLICOMACROPÉPTIDO

Se deriva de la κ -caseína de la leche durante el proceso de elaboración del queso por la acción específica de la quimosina, cuya función es hidrolizar el enlace peptídico Met₁₀₅-Phe₁₀₆, desestabilizando el sistema micelar de las caseínas (Córdova-Dávalos *et al.*, 2019).

El glicomacropéptido se compone de 64 aminoácidos y es termoestable. Las moléculas de glicomacropéptido tienen características únicas debido a la ausencia de residuos de fenilalanina, triptófano, tirosina, histidina, arginina o cisteína. La ausencia de fenilalanina hace de esta proteína un valioso ingrediente dietético para los pacientes que padecen fenilcetonuria. Además, es rico en aminoácidos de cadena ramificada (Yadav *et al.*, 2015; Dullius *et al.*, 2018).

- INMUNOGLOBULINAS

Las inmunoglobulinas son anticuerpos que constituyen del 8% al 10% del total de las proteínas del suero, provienen de la sangre del animal y constan de moléculas de glucoproteínas con un alto contenido de grupos azufrados (Hernández-Rojas y Vélez-Ruiz, 2014).

Se designan cinco clases de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM; IgG tiene dos subclases, IgG1 e IgG2. El contenido total de inmunoglobulinas en el suero es de alrededor de 0.7 g/L y las IgG constituyen hasta el 80% p/p del total. Son complejos principalmente heteroméricos (IgG está presente en forma monomérica) en donde las moléculas monoméricas consisten en una estructura básica en forma de Y, compuesta por cuatro subunidades polipeptídicas: dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas

ligeras idénticas; cada par de cadenas pesada y ligera está unido por enlaces disulfuro, así como también unen las dos cadenas pesadas (Maibom-Thomsen *et al.*, 2019).

El papel principal de las inmunoglobulinas es aglutinar las bacterias, neutralizar las toxinas e inactivar los virus. La IgA neutraliza virus, toxinas bacterianas y, tanto esta como IgG pueden soportar la digestión gástrica, pero es IgA la que presenta una mayor estabilidad. La IgM es más eficiente que otras inmunoglobulinas en términos de fijación del complemento, neutralización de virus y aglutinación de bacterias. Además, las inmunoglobulinas son componentes importantes de la membrana del glóbulo de grasa y contribuyen a las propiedades antibacterianas naturales de la leche (Yadav *et al.*, 2015; Bansal y Bhandari, 2016).

- ALBÚMINA DE SUERO BOVINO

También llamada albúmina sérica bovina, seroalbúmina o BSA por sus siglas en inglés, es una proteína globular de la sangre y de la leche, se deriva de la circulación sanguínea por lo que no es sintetizada por la glándula mamaria. Tiene una estructura terciaria con 3 dominios del mismo tamaño globular y su estructura primaria es de 583 aminoácidos de longitud (66 kDa), con 17 enlaces disulfuro y un sulfhidriilo libre (Hernández-Rojas y Vélez-Ruíz, 2014; Arrutia *et al.*, 2016).

Tiene una temperatura de desnaturalización de 64 °C. Aunque la temperatura a la que se desnaturaliza es un poco más alta en comparación con la de la α -lactalbúmina, esta precipita antes de la α -lactalbúmina debido a la naturaleza reversible del precipitado de α -lactalbúmina. Una característica importante es su capacidad para unirse reversiblemente a varios ligandos y, debido a esto, se puede usar como portador de ácidos grasos (Yadav *et al.*, 2015).

- LACTOFERRINA

Otra proteína del suero es la lactoferrina, esta se encuentra en menor proporción que todas las proteínas del suero mencionadas anteriormente. Es una glicoproteína que

pertenece a la familia de proteínas de las transferrinas. Es una proteína ligante de hierro segregada no sólo por la glándula mamaria sino también por las mucosas lacrimal, bronquial, salivar, renal y endométrica. Tiene funciones biológicas potenciales: mejora la biodisponibilidad del Fe^{3+} y es un bacteriostático debido que al secuestrar el Fe^{3+} no lo deja disponible para las bacterias (Edwards y Jameson, 2014).

La lactoferrina del suero de leche se compone de una cadena polipeptídica de aproximadamente 700 aminoácidos, tiene dos sitios de unión para iones férricos y puede contener una o dos cadenas de carbohidratos (Hernández-Rojas y Vélez-Ruíz, 2014). Tiene un punto isoeléctrico de 9.5 (para la variante A) y de 10.0 (para la variante B). Las moléculas de lactoferrina son estables al calor y resistentes a los ácidos a pH 4.0. También es resistente a la acción de la tripsina y de la quimotripsina, pero se puede hidrolizar con pepsina (Yadav *et al.*, 2015). La concentración de lactoferrina en la leche bovina y calostro es de aproximadamente 0.2 mg/mL y 1.5 mg/mL, respectivamente (Hernández-Rojas y Vélez-Ruíz, 2014).

- LACTOPEROXIDASA

La lactoperoxidasa es una enzima natural del sistema de defensa de los mamíferos (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011). Esta enzima se compone de 612 residuos de aminoácidos. Contiene 15 cisteínas, un grupo hemo y aproximadamente 10% p/p de carbohidratos. Es más termoestable que la fosfatasa alcalina, ya que resiste la pasteurización cuando esta se realiza a temperaturas menores a 75 °C y se inactiva a temperaturas de entre 75 °C a 80 °C; por lo tanto, si la leche se expone a temperaturas mayores a 75 °C, la enzima permanecerá inactiva (Ritota *et al.*, 2017).

- PROTEOSA-PEPTONA

Las proteosa-peptonas consisten en una mezcla muy compleja de péptidos que se originan por la acción de la plasmina presente en la leche. Se obtienen cuando la plasmina hidroliza específicamente ciertos enlaces peptídicos de β -CN generando las proteosa-peptonas y caseínas γ . Las proteosa-peptonas: PP3, PP5, PP8_{lento} y PP8_{rápido}, reciben sus nombres debido a su diferente movilidad electroforética (O'Mahony y Fox,

2013).

Las fracciones peptídicas PP5, PP8_{lento} y PP8_{rápido} corresponden a los fragmentos Arg₁-Lys₁₀₅/Lys₁₀₇, Lys₂₉-Lys₁₀₅/Lys₁₀₇ y Arg₁-Lys₂₈, respectivamente. Por otro lado, PP3, la fracción que se encuentra en mayor proporción, ya que representa un 25% en peso de todas las proteosa-peptonas, parece derivar de la membrana del glóbulo de grasa (O'Mahony y Fox, 2014).

Como se mencionó anteriormente, las proteínas del suero de leche tienen bioactividades las cuales están encriptadas dentro de su secuencia nativa. Algunas de estas bioactividades se muestran en el Cuadro 5.

Se ha reportado que la bioactividad de las proteínas del suero se atribuye a ciertas secuencias de aminoácidos y por lo tanto se exhibe cuando se liberan como péptidos (Welsh *et al.*, 2017).

Cuadro 5. Bioactividades de las proteínas del suero de leche	
Proteínas	Bioactividad
β-lactoglobulina	Transferencia de inmunidad pasiva
α-lactalbúmina	Anticancerígena
glicomacropéptido	Inmunomoduladora, interacción con toxinas, virus y bacterias
inmunoglobulinas	Inmunomoduladora, antimicrobiana
albúmina de suero bovino	Antimutagénica, anticáncer, inmunomoduladora
lactoferrina	Antifúngica, antibacteriana, antiviral, inmunomoduladora, anticancerígena
lactoperoxidasa	Antiviral, antiinflamatorio, anticancerígena
proteosa-peptona	Efectos inmunoestimulantes

(Cuadro basado en información de Hernández-Rojas y Vélez-Ruiz, 2014; Yadav *et al.*, 2015)

Los péptidos bioactivos provenientes de las proteínas del suero de leche han demostrado tener actividad antioxidante, antihipertensiva, antimicrobiana, opioide, antitrombótica, inmunomoduladora, anticancerígenas, hipocolesterolémica, entre otras (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2016; Baracé *et al.*, 2017; Dullius *et al.*, 2018).

Dentro de todas sus bioactividades, se hará énfasis en los péptidos con actividad:

- a) Antioxidante
- b) Antihipertensiva
- c) Antimicrobiana
- d) Opioide

3.1.1. PÉPTIDOS BIOACTIVOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Desde el punto de vista químico los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan uno o más electrones desapareados en el orbital externo, generando una configuración inestable y, por lo tanto, un carácter altamente reactivo con enorme capacidad para combinarse con otras moléculas (Amin *et al.*, 2019). En células y tejidos la mayoría de los radicales libres producidos son oxidantes y pueden atacar a una multitud de biomoléculas del entorno (carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos, etc.) para producir nuevos radicales libres, los cuales, a su vez, atacan a otros compuestos, iniciándose así una reacción en cadena. Por lo tanto, la formación de un solo radical libre puede iniciar un gran número de reacciones químicas que al final trastornan el funcionamiento normal de las células (Brown *et al.*, 2013).

Es importante resaltar que los radicales libres se generan a través de reacciones normales dentro de nuestro cuerpo (metabolismo oxidativo) como un efecto secundario, por medio de procesos celulares como la señalización celular, relajación muscular, fagocitosis, etc., (Amin *et al.*, 2019).

En condiciones normales, los sistemas de defensa antioxidantes pueden eliminar especies reactivas a través de antioxidantes enzimáticos (como la superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) y antioxidantes no enzimáticos (como vitaminas antioxidantes, oligoelementos, coenzimas y cofactores). Sin embargo, en ciertas circunstancias, el sistema de defensa endógeno no protege al cuerpo contra los radicales reactivos por sí mismo. Esto resulta en un estrés oxidativo, una condición en la cual la generación de moléculas altamente reactivas como las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés) exceden su eliminación y/o cuando su eliminación es inadecuada. Provocando la oxidación de biomoléculas como el ADN, las proteínas, los lípidos y las moléculas celulares pequeñas (Athira *et al.*, 2015).

En general, las especies reactivas conducen al daño y muerte celular ya que oxidan los lípidos de la membrana, las proteínas celulares, el ADN e inactivan las enzimas, lo que detiene la respiración celular. También modifican las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Esto está involucrado con el inicio o el progreso de varias enfermedades crónicas degenerativas. En los seres humanos, el estrés oxidativo generalmente desempeña más el papel de promotor en lugar de iniciador de enfermedades. Algunas de estas enfermedades son: aterosclerosis, artritis, diabetes, ciertos tipos de cáncer, osteoporosis, obesidad, procesos reumáticos, alteraciones cardíacas y metabólicas, Alzheimer, Parkinson (Barac *et al.*, 2017), cataratas, trastornos neurodegenerativos (Athira *et al.*, 2015) e incluso procesos naturales como el envejecimiento. De acuerdo con la teoría de los radicales libres del envejecimiento desarrollada por Denham Harman los organismos envejecen cuando los radicales libres se acumulan en las células y causan daños con el tiempo (Sarmadi e Ismail, 2010). La principal característica de estas enfermedades es que son causadas por procesos oxidativos, mediados principalmente por especies radicales.

Por otro lado, en productos alimentarios, durante el procesamiento y almacenamiento, los radicales libres causan la oxidación de lípidos, el desarrollo de rancidez, sabor inaceptable y reducen la vida útil del alimento.

Para evitar que los alimentos se deterioren y para brindar protección contra los procesos que promueven el desarrollo de enfermedades, hay una necesidad de antioxidantes sintéticos y naturales. Por un lado, los antioxidantes sintéticos son rentables y eficientes, pero muestran algunos efectos tóxicos y peligrosos; por otro lado, los antioxidantes naturales de los recursos alimentarios han sido el foco del creciente interés por sus beneficios potenciales para la salud con pocos o ningún efecto secundario (Amin *et al.*, 2019).

Se puede definir antioxidante como cualquier sustancia que, en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato. Son moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre y su reposición debe ser continua (Kumar *et al.*, 2017).

Aplicado al ser humano, un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, liberando electrones en nuestra sangre que son captados por los radicales libres, manteniendo su estabilidad (Aune *et al.*, 2018).

Estudios han demostrado que las proteínas del suero de leche tienen actividad antioxidante, atribuible a ciertas secuencias de aminoácidos codificadas en ellas. La actividad antioxidante aumenta mediante la hidrólisis enzimática, ya que, al hidrolizarse las proteínas, se obtienen los péptidos bioactivos responsables de esta actividad (Welsh *et al.*, 2017). A pesar de esto, los hidrolizados pueden contener componentes tanto antioxidantes como pro-oxidantes, convirtiéndolos en un sistema antioxidante menos eficiente. Cabe resaltar que el efecto antioxidante depende de las condiciones de hidrólisis y de la especificidad de la enzima utilizada (Barac *et al.*, 2017).

Teniendo en cuenta la utilidad de estos péptidos bioactivos desde el punto de vista de la salud humana como de la tecnología de los alimentos, los esfuerzos de investigación van en aumento y se centran en la obtención de péptidos bioactivos derivados de las proteínas del suero (Segalin *et al.*, 2014).

Los péptidos bioactivos con actividad antioxidante son aquellos péptidos de 5 a 16 residuos de aminoácidos cuya habilidad parece estar relacionada con su estructura peptídica, su composición (Baracé *et al.*, 2017), hidrofobicidad y su secuencia de aminoácidos. Generalmente poseen en común algunas características: cadena corta, presencia de aminoácidos hidrofóbicos en su estructura y la resistencia a la proteólisis (Brandelli *et al.*, 2015; Sánchez-Mendoza *et al.*, 2016).

Los aminoácidos hidrofóbicos (como Tyr, Trp, Met, Pro) (Sharma *et al.*, 2014; Brandelli *et al.*, 2015) y Lys, Cys e His; Val o Leu en el extremo N-terminal, son ejemplos de aminoácidos que producen actividad antioxidante (Dullius *et al.*, 2018). Además, los aminoácidos con residuos aromáticos pueden donar protones a los radicales deficientes en electrones. Se propone que la actividad antioxidante de los péptidos que contienen His está en relación con la donación de hidrógeno, la captura del radical peróxido lipídico y/o la capacidad de quelación de iones metálicos del grupo imidazol. Por otro lado, el grupo SH en la cisteína tiene una acción crucial antioxidante independiente debido a su interacción directa con los radicales (Sharma *et al.*, 2014).

Además de la presencia de aminoácidos adecuados, su correcto posicionamiento en la secuencia peptídica desempeña un papel importante en la actividad antioxidante de los péptidos. Se ha afirmado que el enlace peptídico y/o las características estructurales específicas de los péptidos influyen en la actividad antioxidante (Baracé *et al.*, 2017).

También se ha declarado que la configuración de los péptidos puede afectar la actividad antioxidante. Se encontró que la sustitución de L-His por D-His en un péptido antioxidante conduce a la reducción de la actividad. Sarmadi e Ismail (2010), concluyeron que el posicionamiento correcto del grupo imidazol es el factor clave en la actividad antioxidante.

Otros factores también pueden influir en la actividad antioxidante de los péptidos bioactivos. Las actividades antioxidantes y biológicas pueden verse afectadas por las condiciones operativas aplicadas para aislar proteínas, grado de hidrólisis, tipo de

proteasa, estructura peptídica y concentración de péptidos, además el peso molecular de los péptidos puede influir en la actividad antioxidante (Sarmadi e Ismail, 2010).

En general, la actividad antioxidante de los péptidos bioactivos puede atribuirse a la desactivación/eliminación de radicales libres, la inhibición de la peroxidación de lípidos, la quelación de iones metálicos o la combinación de los mismos.

Los estudios que investigan los efectos de los péptidos bioactivos los aplican en dos formas diferentes: como hidrolizados de proteínas precursoras o como péptidos bioactivos. El hidrolizado es una mezcla que se compone principalmente de péptidos y aminoácidos, se obtiene mediante un tratamiento con enzimas, ácidos o álcalis o, fermentación. Los péptidos bioactivos, por otro lado, son varios aminoácidos unidos purificados a partir de hidrolizados (Sharma *et al.*, 2014; Athira *et al.*, 2015). Para identificar péptidos bioactivos con actividad antioxidante a partir de proteínas del suero de leche, el tratamiento más utilizado y reportado es la hidrólisis enzimática, seguida de la posterior caracterización de los fragmentos con mayor actividad antioxidante (Figura 6).

En la identificación de péptidos bioactivos del suero de leche con actividad antioxidante, se utilizan aislados o concentrados de esta proteína. A partir de estos se realiza la hidrólisis enzimática, la cual requiere de un pretratamiento térmico antes de la adición de la enzima. Es importante resaltar que la especificidad de la enzima influye en la actividad antioxidante, es por esto que se han utilizado diversas enzimas, de las cuales los mejores resultados se han obtenido con la colorasa-PP y alcalasa (Čurda *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2014; Athira *et al.*, 2015).

Una vez terminada la hidrólisis se determina el grado de hidrólisis, concentración de proteína y actividad antioxidante de las muestras recolectadas.

Para realizar dichas determinaciones, las muestras son sometidas a centrifugación, proceso del cual solo se utiliza el sobrenadante, que posteriormente es secado por

lío-filización, separando a las proteínas del suero que no fueron hidrolizadas y que precipitan por el calentamiento aplicado para inactivar a la enzima.

Metodológicamente es necesario tomar una muestra antes de la adición de la enzima (T_0) y durante cada cierto tiempo para determinar el tiempo de mayor hidrólisis y mayor actividad antioxidante (Čurda *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2014; Athira *et al.*, 2015).

El grado de hidrólisis es el parámetro clave para el seguimiento y control de las reacciones de hidrólisis de proteínas. Representa la proporción de enlaces peptídicos hidrolizados sobre el número total de enlaces. Se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación (Hsu *et al.*, 2013):

$$\text{grado de hidrólisis} = (h/h_{\text{tot}})(100\%)$$

h = número de enlaces peptídicos hidrolizados

h_{tot} = número total de enlaces peptídicos presentes en la proteína nativa

Ambos h y h_{tot} son expresados en meq/g.

Por otro lado, los métodos para evaluar la actividad antioxidante son:

- ORAC. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno.
- TRAP. Parámetro antioxidante que atrapa los radicales.
- Blanqueamiento del β -caroteno.
- ABTS. Capacidad de estabilizar el radical catión coloreado $\text{ABTS}^{\bullet+}$, el cual es formado previamente por la oxidación del ABTS (ácido 2'2-azino-bis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]).
- FRAP. Capacidad de reducción férrica, también llamado poder de reducción antioxidante del ión férrico.
- DPPH. Capacidad de eliminación de radicales de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.

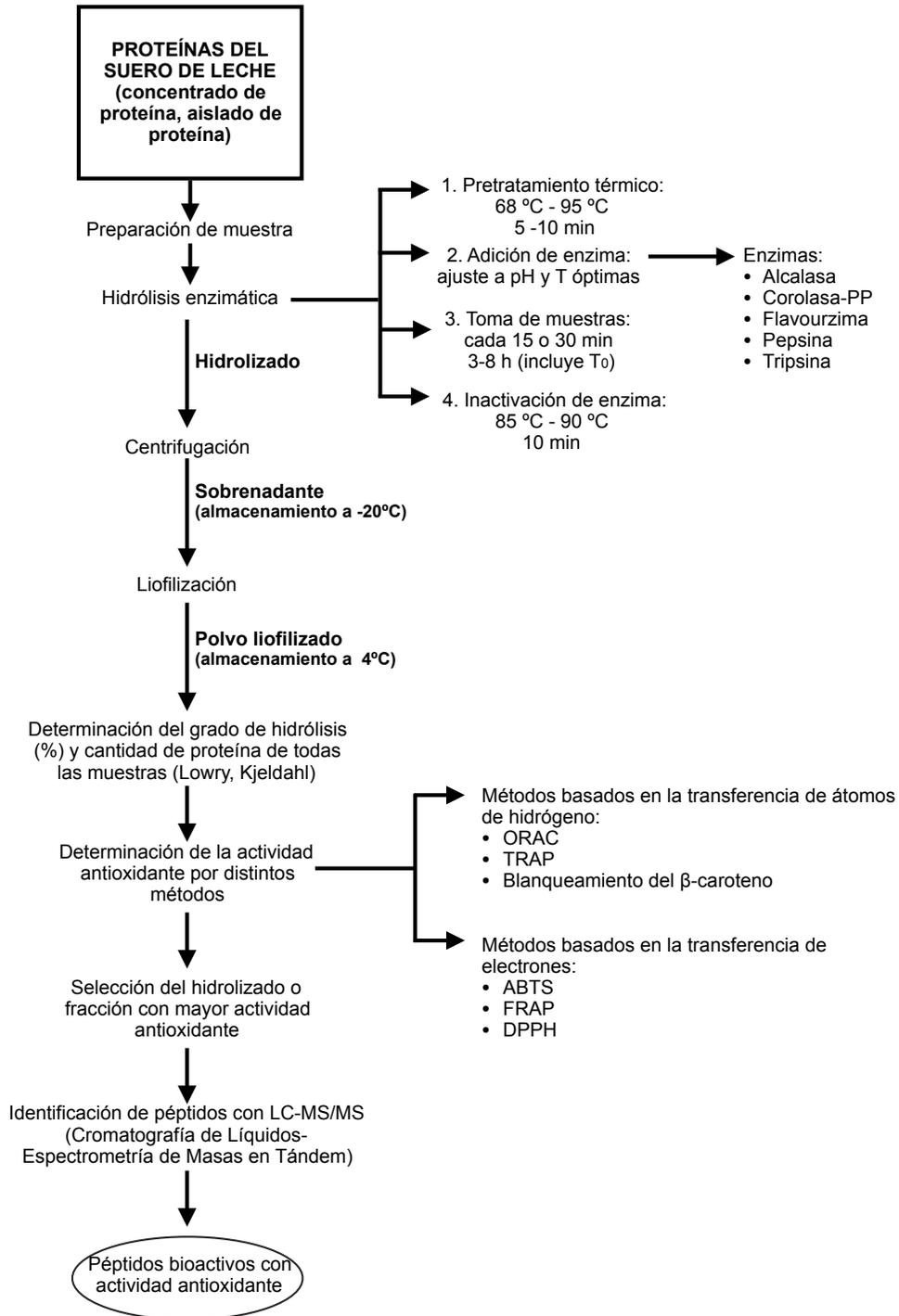


Figura 6. Proceso general para la identificación de péptidos bioactivos con actividad antioxidante.

(Figura basada en información de Čurda *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2014; Athira *et al.*, 2015)

Cabe resaltar que, aunque existen todos estos métodos mencionados para evaluar la actividad antioxidante, no existe uno que refleje de forma completa el perfil antioxidante, por lo que lo más acertado es la comparación de diferentes métodos para facilitar la interpretación de resultados.

Una vez seleccionado el hidrolizado o muestra con mayor actividad antioxidante, para identificar los péptidos con esta actividad, se ha utilizado generalmente espectrometría de masas, cromatografía de gases, análisis de secuencias o determinación de aminoácidos. En este caso se realiza la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). En varios estudios se describe que un paso previo a esta, se hace una ultrafiltración del hidrolizado (3000 Da), el permeado obtenido se concentra por liofilización y es identificado por LC-MS/MS (Čurda *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2014; Athira *et al.*, 2015). Los péptidos identificados con actividad antioxidante se muestran en el Cuadro 6.

Otros métodos para la identificación de estos péptidos son: emulación de la digestión gastrointestinal, fermentación microbiana y síntesis química (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2016).

Cuadro 6. Péptidos provenientes de las proteínas del suero identificados con actividad antioxidante

<i>Proteína origen</i>	<i>Enzima utilizada</i>	<i>Secuencia de Aminoácidos</i>	<i>Fragmento de proteína</i>	<i>Referencias</i>
β-lactoglobulina	colorasa-PP	WYSLAMAASDI	f (19 - 29)	Hernández-Ledesma <i>et al.</i> , 2005
	-	LNENK	f (87 - 91)	del Mar Contreras <i>et al.</i> , 2011
	colorasa-PP	MHIRL	f (145 - 149)	Hernández-Ledesma <i>et al.</i> , 2005
	-	IAEKTIP	f (72 - 79)	Sadat <i>et al.</i> , 2011
	colorasa-PP	YVEEL	f (42 - 46)	Hernández-Ledesma <i>et al.</i> , 2005
	alcalasa	VRTPEVDDE	f (123 - 131)	Athira <i>et al.</i> , 2015
		LVRTPEVDDE	f (122 - 131)	Athira <i>et al.</i> , 2015
		VRTPEVDDEALE	f (123 - 134)	Athira <i>et al.</i> , 2015

Cuadro 6. Péptidos provenientes de las proteínas del suero identificados con actividad antioxidante

	termolisina	VRTPEV	f (123 - 128)	del Mar Contreras <i>et al.</i> , 2011
β-lactoglobulina		VDDEA	f (128 - 132)	del Mar Contreras <i>et al.</i> , 2011
		LDTDYKK	f (95 - 101)	del Mar Contreras <i>et al.</i> , 2011
α-lactalbúmina	-	INYW	f (101 - 104)	Sadat <i>et al.</i> , 2011
Concentrado de proteína	alcalasa	WYSL	-	Zhang <i>et al.</i> , 2013

3.1.2. PÉPTIDOS BIOACTIVOS CON ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA

Las enfermedades cardiovasculares son un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos. Se clasifican en:

- a) Hipertensión arterial (presión alta).
- b) Cardiopatía coronaria (infarto de miocardio).
- c) Enfermedad cerebrovascular (apoplejía).
- d) Enfermedad vascular periférica.
- e) Insuficiencia cardíaca.
- f) Cardiopatía reumática.
- g) Cardiopatía congénita.
- h) Miocardiopatías.

Estas enfermedades son la principal causa de defunción en todo el mundo de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2019). La hipertensión es reconocida como un factor de riesgo grave e independiente para estas enfermedades, además, tiene características de trastornos frecuentes, crónicos y relacionados con la edad. Por lo tanto, el tratamiento para reducir la presión arterial puede prevenir enfermedades cardiovasculares (Wang *et al.*, 2018).

La enzima convertidora de angiotensina I (ECA, EC 3.4.15.1), pertenece a la familia de metalopeptidasas de zinc, es una exopeptidasa y elimina un dipéptido del extremo C-

terminal de varios sustratos peptídicos (Pihlanto-Leppälä, 2002). La ECA desempeña un papel central en la regulación de la presión arterial *in vivo* a través de su acción en dos sistemas corporales (Wang *et al.*, 2018):

- a) Sistema Renina-Angiotensina (SRA).
- b) Sistema Calicreína-Cinina (SCC).

El SRA regula la presión arterial periférica, en este sistema la angiotensina I (un decapeptido inactivo) es hidrolizada por la ECA y se libera la angiotensina II (octapeptido activo), un potente vasoconstrictor (produce el estrechamiento de los vasos sanguíneos) que interviene en la homeostasis cardiovascular y renal, induce la liberación de aldosterona y, por lo tanto, aumenta la concentración de sodio y la presión arterial. Por otro lado, en el SCC, la ECA inactiva la bradiquinina vasodilatadora (Wang *et al.*, 2018).

En particular, la ECA es una enzima que tiene un papel clave en ambos sistemas y, por lo tanto, regula la presión arterial y el equilibrio del agua y la sal en el cuerpo. El problema está cuando la ECA cataliza la hidrólisis de la angiotensina I y la degradación de la bradiquinina en mayor medida de lo necesario (Brandelli *et al.*, 2015).

En consecuencia, las sustancias que inhiben la ECA se usan para disminuir la presión arterial. Muchos potentes inhibidores de la ECA sintéticos se usan actualmente para el tratamiento clínico de la hipertensión en humanos, algunos de estos son: captopril, enalapril, alcacepril y lisinopril (Daskaya-Dikmen *et al.*, 2017). Sin embargo, tienen varios efectos secundarios. Por lo tanto, los inhibidores de la ECA derivados de los alimentos con características de seguridad mejoradas, en comparación con los sintéticos, han atraído la atención de una amplia gama de fuentes (Wang *et al.*, 2018). Es aquí donde entra el papel de los péptidos bioactivos provenientes del suero de leche, ya que se ha demostrado que estos tienen actividad antihipertensiva.

no puede acomodar moléculas peptídicas largas (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011). Se cree que la conformación peptídica juega un rol significativo en péptidos inhibidores de la ECA de cadena larga (Dullius *et al.*, 2018).

La identificación de péptidos bioactivos con actividad antihipertensiva a partir de proteínas del suero de leche, se hace a través de la hidrólisis enzimática, tratamiento más utilizado y reportado, seguida de la posterior caracterización de los fragmentos con mayor actividad antihipertensiva, como se muestra en la Figura 8. Para la hidrólisis de las proteínas del suero de leche se utilizan principalmente aislados o concentrados de β -lactoglobulina y α -lactalbúmina. La extensión de la hidrólisis enzimática favorece la generación de péptidos constituidos por pocos residuos de aminoácidos (Recio *et al.*, 2011; Silvestre *et al.*, 2013; Morais *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018).

Después de la centrifugación y la liofilización de los hidrolizados, se realiza la caracterización del perfil peptídico, que consiste en tres pasos como se muestra en la Figura 8. Primero se realiza el fraccionamiento del hidrolizado de acuerdo al tamaño de los péptidos que contiene mediante la cromatografía de exclusión molecular SE-HPLC (*Size Exclusion-High Performance Liquid Chromatography*). Cada una de estas fracciones obtenidas se cuantifican (en porcentaje en nmol) los péptidos y aminoácidos libres mediante el método rápido de CFA (*Correct Fraction Area*) y, finalmente se obtiene el perfil peptídico por RP-HPLC (*Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography*) (Recio *et al.*, 2011; Silvestre *et al.*, 2013; Morais *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018).

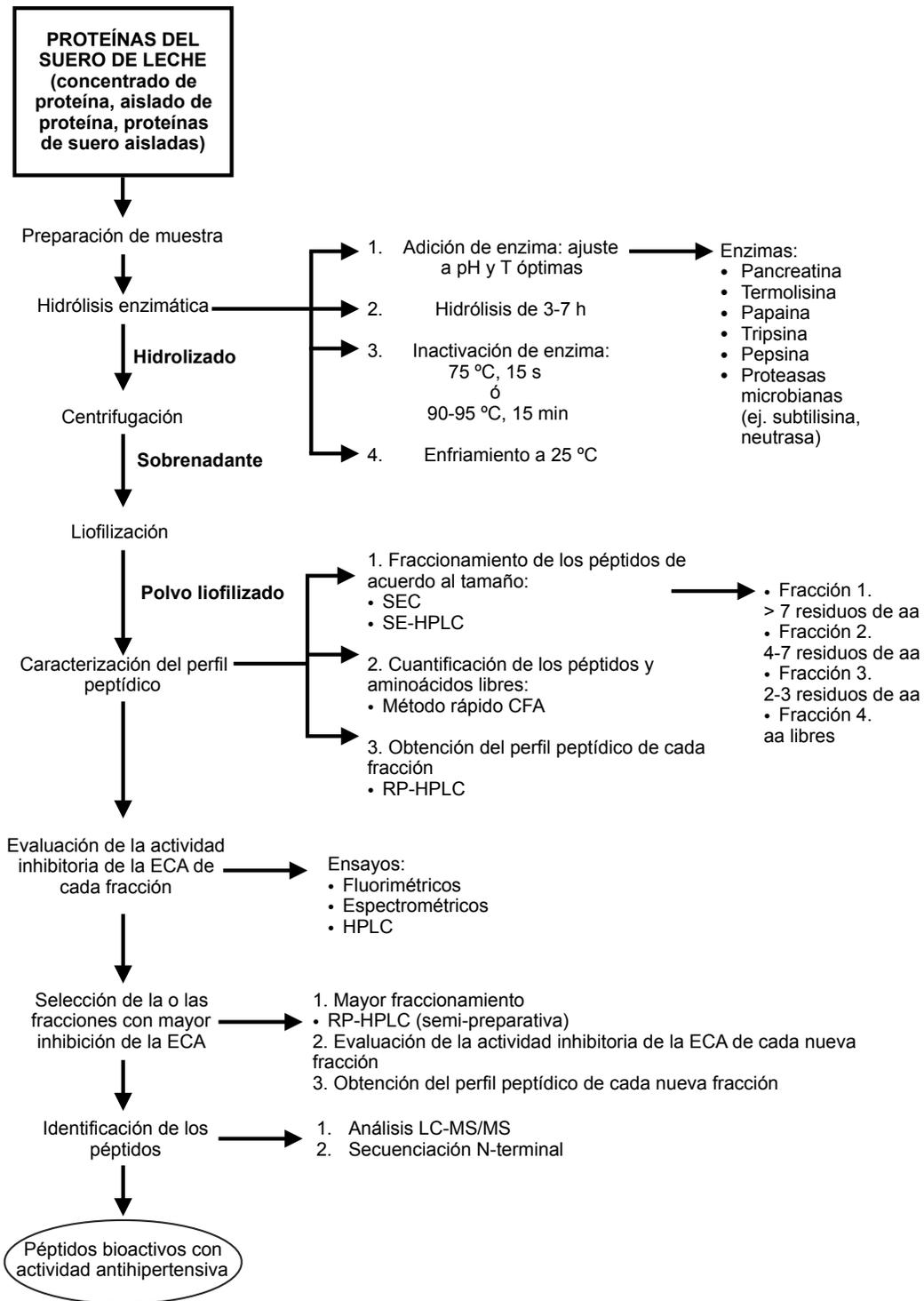


Figura 8. Proceso general para la identificación de péptidos bioactivos con actividad antihipertensiva.

(Figura basada en información de Recio *et al.*, 2011; Silvestre *et al.*, 2013; Morais *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018)

Una vez que se tiene toda esta información, se relaciona con la capacidad para inhibir a la ECA. Para determinar esto, se han utilizado ensayos fluorimétricos, espectrométricos y cromatográficos. El método mayormente utilizado es el desarrollado por Wu, Aluko y Muir en el 2002 (citado en Silvestre *et al.*, 2013; Morais *et al.*, 2018) en el que se utiliza HHL (hipuril-histidil-leucina) como sustrato, al que se le adiciona la fracción del hidrolizado y posteriormente la ECA. Al término de la incubación a 30 °C por 30 min, la reacción se detiene con la adición de HCl, y se analiza por RP-HPLC. En este método la capacidad para inhibir a la ECA se mide con la absorbancia del ácido hipúrico a 228 nm (Yadav *et al.*, 2015). La actividad inhibidora de la ECA se expresa de dos maneras: como un porcentaje de inhibición y como un valor de IC₅₀, que se define como la concentración de hidrolizado o en este caso fracción de hidrolizado (mg/mL) necesaria para reducir la actividad de la enzima en un 50% (Silvestre *et al.*, 2013; Morais *et al.*, 2018).

Con estos resultados se seleccionan la o las fracciones que contienen los péptidos con mayor inhibición de la ECA y se obtiene su perfil peptídico. Además, para identificar concretamente a los péptidos con esta capacidad, se hace un mayor fraccionamiento, sometiendo estas fracciones a una RP-HPLC en escala semi-preparativa (la cual se utiliza para purificar pequeñas cantidades de componentes) obteniendo así subfracciones, de las cuales de igual forma se determina su capacidad para inhibir a la ECA y su perfil peptídico. Con esto se selecciona la subfracción o subfracciones que inhiben a la ECA y, si es necesario, se realiza una posterior semipurificación por RP-HPLC (Recio *et al.*, 2011; Silvestre *et al.*, 2013; Morais *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018).

Finalmente, como se muestra en la Figura 8, para identificar los péptidos aislados, se realiza el análisis LC-MS/MS y se confirma con la secuenciación del N-terminal. Los péptidos identificados con actividad antihipertensiva se muestran en el Cuadro 7.

Algunos de los péptidos identificados de las proteínas del suero de leche con actividad antihipertensiva también son conocidos como “lactoquininas”.

Cuadro 7. Péptidos provenientes de las proteínas del suero identificados con actividad antihipertensiva

<i>Proteína origen</i>	<i>Enzima utilizada</i>	<i>Secuencia de Aminoácidos</i>	<i>Fragmento de proteína y nombre común</i>	<i>Referencias</i>
β -lactoglobulina	pepsina tripsina	GLDIQK	f (9 - 14)	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> , 1998
	-	VAGTWY	f (15 - 20)	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> , 1998
	-	IIAEK	f (71 - 75)	Power <i>et al.</i> , 2014
	-	IPAVFK	f (78 - 83)	Power <i>et al.</i> , 2014
	proteínasa K	IPA	f (78 - 80)	Abubakar <i>et al.</i> , 1998
	-	YLLF	f (102 - 105) β -lactofina (amida)	Mullally <i>et al.</i> , 1996
	-	HIRL	f (146 - 149)	Mullally <i>et al.</i> , 1996
	tripsina	ALPMHIR	f (142 - 148) β -lactofina	Mullally <i>et al.</i> , 1997
	pepsina tripsina quimotripsina	CMENSA	f (106 - 111)	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> , 2000
	-	ALPMH	f (142 - 146)	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> , 2000
	pepsina tripsina quimotripsina	VLDTDYK	f(94 - 100)	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> , 2000
	-	VAGTW	f(15 - 19)	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> , 2000
	tripsina	VFK	f (81 - 83)	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> , 2000
		LAMA	f (22 - 25)	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> , 2000
		LDAQSAPLR	f(32 - 40)	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> , 2000
	termolisina	LLF	f (103 - 105) Hernández-Ledesma <i>et al.</i> , 2007	
	proteasa microbiana	DAQSAPLRVY	f (33 - 42) Tavares <i>et al.</i> , 2011	
		RLSFNP	f (148 - 153) Pan y Guo, 2010	
α -lactalbúmina	enzimas gástricas y pancreáticas	YGLF	f (50 - 53)	Nurminen <i>et al.</i> , 2000
	-	EQLTK	f (1 - 5)	van Elswijk <i>et al.</i> , 2003
	neutrasa	LKGYGGSVSLP EW	f (15 - 26)	Otte <i>et al.</i> , 2007
	-	VSLPEW	f (21 - 26)	Otte <i>et al.</i> , 2007
	-	YG	f (18 - 19) ó f (50 - 51)	Mullally <i>et al.</i> , 1996

Cuadro 7. Péptidos provenientes de las proteínas del suero identificados con actividad antihipertensiva

α -lactalbúmina	pepsina	YGL	f (50 - 52)	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> , 2000	
	tripsina			Mullally <i>et al.</i> , 1996	
	pepsina	YGLF	f (50 - 53)	Tavares <i>et al.</i> , 2011	
	-	RELKDL	f (10 - 15)	Tavares <i>et al.</i> , 2011	
	-	DKVGINY	f (97 - 103)	Tavares <i>et al.</i> , 2011	
	-	KGYGGVSLPE W	f (16 - 23)	Tavares <i>et al.</i> , 2011	
	tripsina	VGINYWLAHK	f (99 - 108)	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> , 2000	
		WLAHK	f (104 - 108)	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> , 2000	
	pepsina tripsina	LAHKAL	f (105 - 110)	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> , 1998	
albúmina de suero bovino	proteínasa K	termolisina	GVSLPEW	f (20 - 26)	Otte <i>et al.</i> , 2007
			YGGVSLPEW	f (18 - 26)	Otte <i>et al.</i> , 2007
		FP	f (221 - 222)	Abubakar <i>et al.</i> , 1998	

3.1.3. PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La seguridad y la vida útil de los alimentos son una preocupación importante en la industria alimentaria. Estos se ven afectados por la incidencia de bacterias patógenas y de deterioro que pueden contaminar los alimentos a través de varias rutas. Se ha empleado un amplio espectro de métodos para prevenir su crecimiento en alimentos, incluido el uso de agentes antimicrobianos sintéticos y naturales. Sin embargo, el uso de agentes sintéticos está excluido debido al posible impacto negativo de dichos productos químicos en el medio ambiente y en la salud humana. Por lo tanto, los nuevos agentes antimicrobianos de origen natural son altamente requeridos (Abdel-Hamid, 2015).

Cabe resaltar que los péptidos bioactivos que presentan efectos antimicrobianos poseen aplicaciones potenciales tanto en la calidad y seguridad de los alimentos como en la salud humana. En los últimos años, los esfuerzos crecientes se centran en la caracterización de los hidrolizados y péptidos de proteína de suero, postulando su uso

como conservadores de grado alimentario e ingredientes funcionales (Brandelli *et al.*, 2015).

Los péptidos antimicrobianos pueden actuar sobre las bacterias sensibles de diferentes maneras dependiendo de la variabilidad en su composición de aminoácidos y características estructurales y fisicoquímicas. Algunos mecanismos de acción son, por ejemplo, mediante la activación de su sistema enzimático autolítico, mediante la formación de poros trans-membrana, mediante la inhibición de su pared y la síntesis de ácidos nucleicos, o cuando actúan en sinergia con otras moléculas innatas del huésped. Debido a la diversidad de los péptidos antimicrobianos, es difícil anticipar el mecanismo exacto de la actividad antimicrobiana (Wimley y Hristova, 2011; Sah *et al.*, 2018).

Estos péptidos generalmente constan de 10 a 50 aminoácidos y tienen dos características físicas comunes: una carga catiónica (generalmente de $+2$ a $+9$) y una proporción significativa de residuos hidrofóbicos ($\geq 30\%$) (Nguyen *et al.*, 2011). Estas permiten alterar la bicapa lipídica de los microorganismos, modificando sus propiedades de permeabilidad (Khan *et al.*, 2018).

Además, la carga catiónica y la hidrofobicidad de estos péptidos influye en que la mayoría de los péptidos antimicrobianos forman estructuras secundarias catiónicas anfipáticas, típicamente α -hélice y hoja β -plegada, que pueden interactuar selectivamente con membranas bacterianas aniónicas mediante interacciones electrostáticas. La rápida permeabilización de la membrana inducida por péptidos es un mecanismo eficaz de acción antimicrobiana (Sibel, 2014).

La carga positiva neta y la hidrofobicidad son las características esenciales que proporcionan actividad antimicrobiana a los péptidos, ya que les permite interactuar con las membranas citoplásmicas para ejercer un efecto antimicrobiano (Agadi *et al.*, 2018). En el caso de las bacterias, se les llama a estos péptidos “antibacterianos” y, aunque se desconoce su mecanismo exacto de acción, se acepta que estos péptidos

interrumpen selectivamente las membranas celulares, y la permeabilización de la membrana celular bacteriana es ampliamente reconocida como su modo de acción. Además, se cree que la disposición estructural anfipática de estos péptidos desempeña un papel fundamental en el mecanismo (Agadi *et al.*, 2018).

El primer paso en esta interacción es la atracción entre el péptido antibacteriano y la membrana de la célula objetivo. Se piensa que esta atracción se produce a través de enlaces electrostáticos entre el péptido catiónico y los componentes cargados negativamente presentes en la envoltura bacteriana externa, como los grupos fosfato dentro de los lipopolisacáridos de bacterias Gram-negativas o los ácidos lipoteicoicos presentes en las superficies de bacterias Gram-positivas. En el caso de las bacterias Gram-negativas, la inserción de los péptidos en la estructura de la membrana externa por interacciones hidrofóbicas conduce a una perturbación en la membrana externa y permeabiliza esta membrana a otras moléculas de péptidos. Como resultado, los péptidos llegan a la membrana citoplasmática en un proceso conducido por interacciones electrostáticas e hidrófobas (Sibel, 2014).

Sin embargo, aunque la potente permeabilización biomembrana a menudo se asocia con la actividad del péptido antibacteriano, aparentemente no siempre se requiere para la actividad. Algunos péptidos ejercen sus efectos a través de modos de acción alternativos o pueden actuar sobre múltiples dianas celulares bacterianas. Por lo tanto, las actividades de los péptidos antibacterianos suelen depender de la interacción con la membrana celular bacteriana. Por ejemplo, varios péptidos, incluidos los péptidos que penetran las células, se translocan y no causan la permeabilización de la membrana. Por lo tanto, la muerte celular bacteriana puede ocurrir por la orientación de procesos intracelulares esenciales. En este caso, después de la inserción de la membrana, los péptidos actúan alterando la integridad física de la bicapa, a través del adelgazamiento de la membrana, la separación transitoria y/o la disrupción de la función de barrera, o se translocan a través de la membrana y actúan sobre objetivos internos (Sibel, 2014).

Se han propuesto varios modelos para describir la permeabilización de la membrana

producida por péptidos antimicrobianos, a continuación, se citan los más destacados (Wimley y Hristova, 2011; Sah *et al.*, 2018):

- Modelo de barril: en este modelo, una vez que el péptido se une al exterior de la membrana, se agrupan en una especie de barril que delimita un poro, en el cual las cadenas laterales de los aminoácidos no polares entran en contacto con las colas alifáticas de los ácidos grasos al interior de la bicapa lipídica, mientras que las cadenas hidrofílicas quedan expuestas al solvente. El tamaño del poro se incrementa a medida que se unen nuevos péptidos, causando la muerte celular debido a la pérdida de componentes intracelulares y al desbalance osmótico.
- Modelo de alfombra: en este modelo se ha propuesto que los péptidos se distribuyen sobre la superficie de la membrana, cubriéndola hasta alcanzar una concentración límite, la cual se colapsa debido a la formación de pequeñas micelas.
- Modelo del poro toroidal: en este modelo los péptidos se acumulan en la membrana e inducen a la monocapa de lípidos a plegarse sobre sí misma de forma continua, estabilizando la formación del poro toroidal.
- Modelo de agregación: en este modelo los péptidos se orientan en el espacio de la membrana en forma de agregados, pero no adoptan una orientación en particular.

A pesar de los modelos propuestos, en realidad, los mecanismos de acción, así como los efectos en el sistema inmunológico de los péptidos bioactivos con actividad antimicrobiana aún son desconocidos (Holland y Boland, 2014).

Entre las proteínas del suero de leche con actividad antimicrobiana, la lactoferrina, las inmunoglobulinas y la lisozima han sido las más estudiadas. Recientemente la lactoferrina se ha reconocido como la proteína antimicrobiana de la leche (Khan *et al.*, 2018). El proceso para la identificación de péptidos bioactivos con actividad antimicrobiana a partir de proteínas del suero de leche se muestra en la Figura 9.

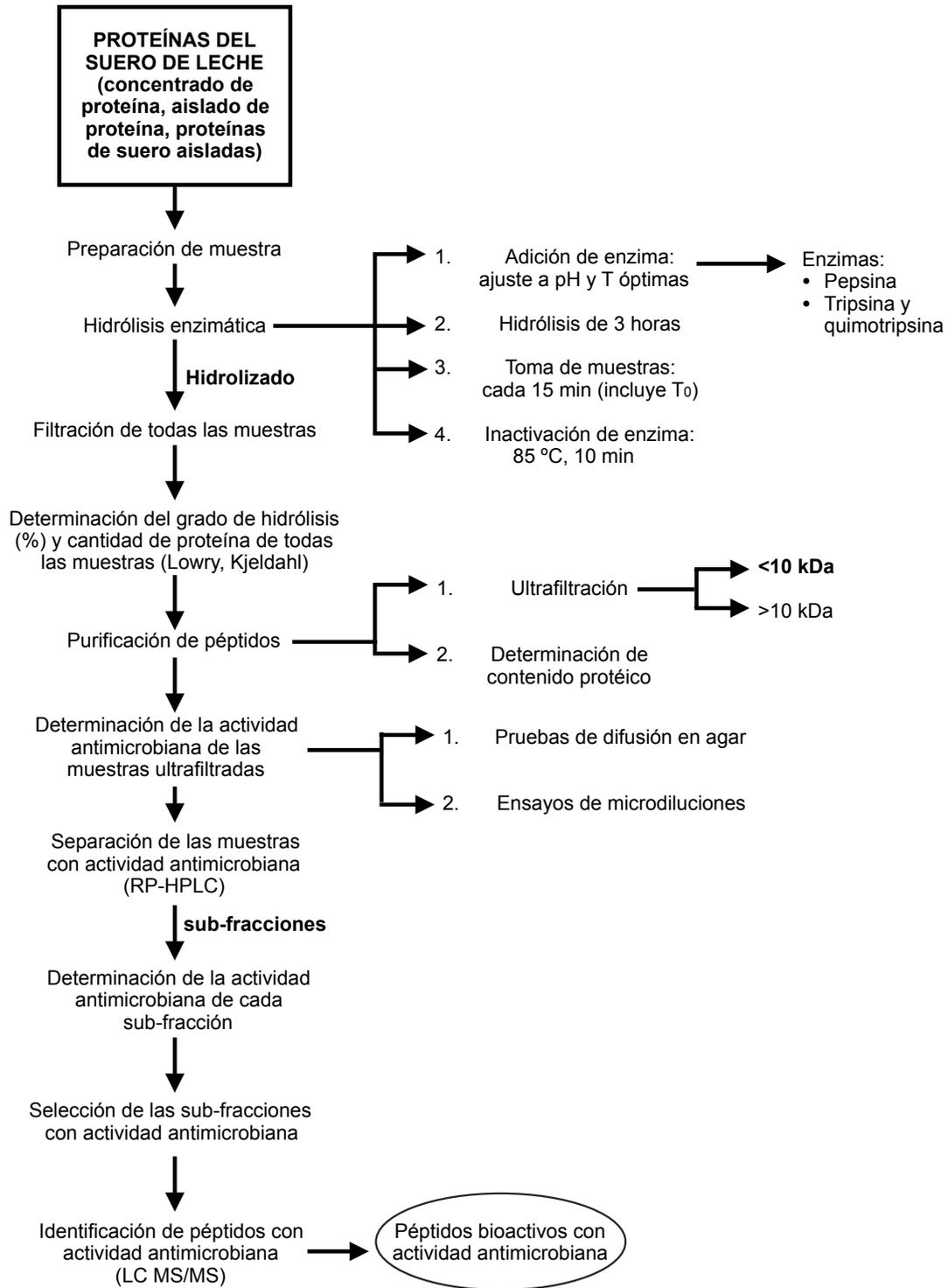


Figura 9. Proceso general para la identificación de péptidos bioactivos con actividad antimicrobiana.

(Figura basada en información de Demers-Mathieu *et al.*, 2013; Théolier *et al.*, 2013; Murata *et al.*, 2013)

Para la identificación de péptidos bioactivos del suero de leche con actividad antimicrobiana, un paso importante es la purificación de péptidos. En esta, se realiza la ultrafiltración de todas las muestras, separándolas en dos fracciones cuya diferencia es su masa: <10 kDa y >10 kDa. Al medir su contenido proteínico y compararlo con el determinado antes de la ultrafiltración, se hace evidente que una fracción de los péptidos tienen una masa mayor a 10 kDa, pero la mayoría se encuentran en la fracción menor a 10 kDa, es por esto que a partir de esta fracción se hacen las siguientes determinaciones (Demers-Mathieu *et al.*, 2013; Théolier *et al.*, 2013; Murata *et al.*, 2013).

La determinación de la actividad antimicrobiana, como se muestra en la Figura 9, se realiza de dos formas, por las pruebas de difusión en agar (en cajas Petri) y los ensayos de microdiluciones. Las pruebas de difusión en agar permiten determinar la sensibilidad de las bacterias (las más empleadas son *Escherichia coli* y *Listeria ivanovii*) frente a los péptidos antimicrobianos y por lo tanto la efectividad de estos péptidos; esto se logra a través del principio de este método, el cual es la difusión de los péptidos antimicrobianos hacia todo el agar, lo que conduce a la inhibición del crecimiento bacteriano mediante la formación de zonas de inhibición. Por otro lado, los ensayos de microdiluciones se llevan a cabo en tubos o pocillos con medios líquidos (caldos), los cuales tienen los péptidos antimicrobianos y en estos se inoculan las bacterias, posterior a la incubación, la presencia de turbidez o sedimentación indica crecimiento del microorganismo (Reyes-Jurado *et al.*, 2014).

A partir de estos resultados, se identifican la o las muestras con actividad antimicrobiana y se someten a un fraccionamiento por RP-HPLC. A las subfracciones obtenidas se les determina su actividad antimicrobiana para poder descartar aquellas que no la presentan. Una vez seleccionadas las subfracciones con actividad antimicrobiana, se identifican los péptidos responsables de esta actividad con LC-MS/MS y se conoce su composición detallada (Demers-Mathieu *et al.*, 2013; Théolier *et al.*, 2013; Murata *et al.*, 2013). Después de la identificación del péptido, las secuencias se sintetizan y se prueban comúnmente contra cepas bacterianas para confirmar la

actividad antimicrobiana (Brandelli *et al.*, 2015).

Se han reportado péptidos antimicrobianos potentes a partir de la lactoferrina como (Khan *et al.*, 2018):

- Lactoferricina (LFcin): f (17-41), FKCRRWNRMKKLGAPSITCVRRAF, generado por degradación de lactoferrina con pepsina, liberado de su dominio N-terminal, efectivo contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos, virus y parásitos. Su función antimicrobiana radica en la ruptura de la membrana celular de las bacterias.
- Lactoferrampina (LFampin): f (268-284), efectivo contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

La lista de péptidos antimicrobianos derivados de lactoferrina está creciendo y se espera que continúe haciéndolo.

Del glicomacropéptido se ha reportado un péptido (Malik *et al.*, 2016):

- Kappacina: f (138-158) caracterizado por poseer un residuo fosforilado de serina (Ser) y por acumularse sobre la membrana celular formando un poro aniónico, efectivo contra bacterias Gram-positivas (*Streptococcus mutans*) y Gram-negativas (*Pseudomonas gingivalis* y *E. coli*).

Además de los tres péptidos antimicrobianos ya mencionados, existen otros derivados de la β -lactoglobulina y α -lactalbúmina, estos se muestran en el Cuadro 8.

3.1.4. PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD OPIOIDE

El término opioide se refiere a cualquier agente endógeno o exógeno que se une a los receptores opioides presentes en el sistema nervioso central, en los tejidos periféricos, incluidos los ganglios simpáticos, la médula suprarrenal y el endotelio vascular (Jauhiainen y Korpela, 2018).

Cuadro 8. Péptidos provenientes de las proteínas del suero identificados con actividad antimicrobiana

<i>Proteína origen</i>	<i>Enzima utilizada</i>	<i>Secuencia de Aminoácidos</i>	<i>Fragmento de proteína y nombre común</i>	<i>Referencias</i>	
β-lactoglobulina	pepsina	KVAGT	f (14 - 18)	Théolier <i>et al.</i> , 2013	
		VRT	f (123 - 125)	Théolier <i>et al.</i> , 2013	
		PEGDL	f (50 - 54)	Théolier <i>et al.</i> , 2013	
		LPMH	f (143 - 146)	Théolier <i>et al.</i> , 2013	
		EKF	f (134 - 136)	Théolier <i>et al.</i> , 2013	
		IRL	f (147 - 149)	Théolier <i>et al.</i> , 2013	
	tripsina y quimotripsina	-	IDALNENK	f (84 - 91)	Demers-Mathieu <i>et al.</i> , 2013
			TPEVDDEALEK	f (125 - 135)	Demers-Mathieu <i>et al.</i> , 2013
		tripsina	PEGDL	f (50 - 54)	Théolier <i>et al.</i> , 2013
			VAGTWY	f (15 - 20)	Pellegrini <i>et al.</i> , 2001
α-lactalbúmina	quimotripsina	AASDISLLDAQSAPLR	f (25 - 40)	Pellegrini <i>et al.</i> , 2001	
		IPAVFK	f (78 - 83)	Pellegrini <i>et al.</i> , 2001	
		VLVLDTDYK	f (92 - 100)	Pellegrini <i>et al.</i> , 2001	
		KVGIN	f (117 - 121)	Théolier <i>et al.</i> , 2013	
		EQLTK	f (1 - 5)	Pellegrini <i>et al.</i> , 1999	
		GYGGVSLPEWVCTTF /ALCSEK	f (17- 31)S-S(109 - 114)	Pellegrini <i>et al.</i> , 1999	

Los péptidos opioides endógenos son neurotransmisores que tienen actividad semejante a los analgésicos opiáceos como la morfina. Se han identificado tres familias distintas de péptidos opioides endógenos: encefalinas, endorfinas y dinorfinas (Jauhiainen y Korpela, 2018). Estos péptidos son ligandos de los receptores opioides con actividades agonistas o antagonistas; se unen a tres tipos de receptores denominados mu (μ), delta (δ) y kappa (κ), todos ellos con siete segmentos transmembranales y acoplados a proteínas G. Una vez que son sintetizados estos péptidos opioides endógenos, son almacenados en vesículas neuronales y pueden ser liberados al espacio intersináptico o hendidura sináptica, donde actúan como neurotransmisores en respuesta a un estímulo nervioso (Morillo *et al.*, 2015). La fisiología de estos péptidos se ha relacionado con su secreción a nivel hipofisario e hipotalámico en los sistemas neurales involucrados con el dolor, en la proliferación

celular, en el control cardiovascular, el estrés y en la respuesta inmune (Jauhiainen y Korpela, 2018).

Cada una de las familias mencionadas deriva de un polipéptido precursor diferente y tiene una distribución anatómica característica. Todos tienen la misma secuencia de aminoácidos N-terminal, Tyr-Gly-Gly-Phe (Jauhiainen y Korpela, 2018). En cuanto a los péptidos opioides exógenos, estos tienen secuencias N-terminales diferentes de las de los péptidos opioides endógenos. Los péptidos opioides ejercen su actividad al unirse a receptores específicos de la célula diana. Los receptores individuales son responsables de efectos fisiológicos específicos por ejemplo, el receptor “ μ ” para el comportamiento emocional y la supresión de la motilidad intestinal, el receptor “ δ ” para el comportamiento emocional y la ingesta de alimentos y, el receptor “ κ ” para la sedación y al igual que el “ δ ”, la ingesta de alimentos (Stefanucci *et al.*, 2018).

La característica estructural común de los péptidos opioides endógenos y exógenos es la presencia de un residuo de Tyr en el extremo N-terminal, junto con la presencia de otro residuo aromático, por ejemplo, Phe o Tyr, en la tercera o cuarta posición (Masood y Khosravi-Darani, 2015). Esto es un importante motivo estructural que encaja en el sitio de unión de los receptores opioides (Dullius *et al.*, 2018). El potencial negativo, localizado en el grupo hidroxilo fenólico de la Tyr, parece ser esencial para la actividad opioide. La falta del residuo Tyr da como resultado una ausencia total de bioactividad. Además, en la segunda posición, es necesario un residuo de Pro para la orientación tridimensional correcta de la tirosina y fenilalanina (Masood y Khosravi-Darani, 2015). Los receptores opioides (tipo μ , δ y κ) están localizados en los sistemas nervioso, endocrino e inmune, así como en el tracto gastrointestinal de los mamíferos y pueden interactuar con sus ligandos endógenos, con opioides exógenos y antagonistas opioides (Stefanucci *et al.*, 2018).

Se han descubierto péptidos bioactivos con actividad opioide provenientes del suero de leche. Dentro de su estructura, se encuentran los péptidos opioides típicos con una secuencia: Tyr-Gly-Gly-Phe, mientras que los atípicos sólo conservan el residuo N-

terminal Tyr (como: Tyr-X-Phe ó Tir-X₁-X₂-Phe). El residuo de tirosina en el extremo N-terminal y la presencia de otro aminoácido aromático en la tercera o cuarta posición forman un importante motivo estructural que se inserta en el sitio de unión de los receptores opioides (Dullius *et al.*, 2018).

Las secuencias más estudiadas estimulan la expresión génica y la secreción de mucina en células intestinales (Dullius *et al.*, 2018). La modulación de la secreción de la mucina, podría ser prometedora para mejorar la protección gastrointestinal (Brandelli *et al.*, 2015). Además, los receptores opioides están involucrados en el efecto antihipertensivo de algunos péptidos.

A diferencia de los procesos previamente descritos, en lugar de evaluar la actividad opioide a los hidrolizados, se evalúa a péptidos sintetizados, potencialmente activos, y cuya secuencia corresponde a las proteínas del suero (Figura 10). En este caso es más fácil identificar este potencial ya que la actividad opioide está estrechamente relacionada con la presencia de aminoácidos específicos en posiciones específicas del péptido.

La síntesis de péptidos es comúnmente realizada en fase sólida, en la que el péptido se va sintetizando en un soporte sólido o resina, cuyo material puede variar. En este soporte, se une el primer aminoácido, bloqueando su extremo C-terminal, ya que el crecimiento de la cadena polipeptídica tiene lugar desde el extremo carboxilo hacia el extremo amino mediante la adición sucesiva de aminoácidos. Durante la síntesis, es necesario que los aminoácidos que se van agregando estén protegidos, es decir, que cuenten con un grupo protector en su cadena lateral y en el extremo α -amino. Los grupos protectores que se utilizan dependen del tipo de grupo funcional del aminoácido y del tipo de estrategia que se emplee en la síntesis. El grupo protector α -amino se elimina antes de la unión del siguiente aminoácido para permitir la formación del enlace peptídico. Este proceso se repite las veces que sea necesario hasta completar la síntesis del péptido. La utilización de grupos protectores es necesaria para evitar la polimerización o reacciones no deseadas (Varnava y Sarojini, 2019).

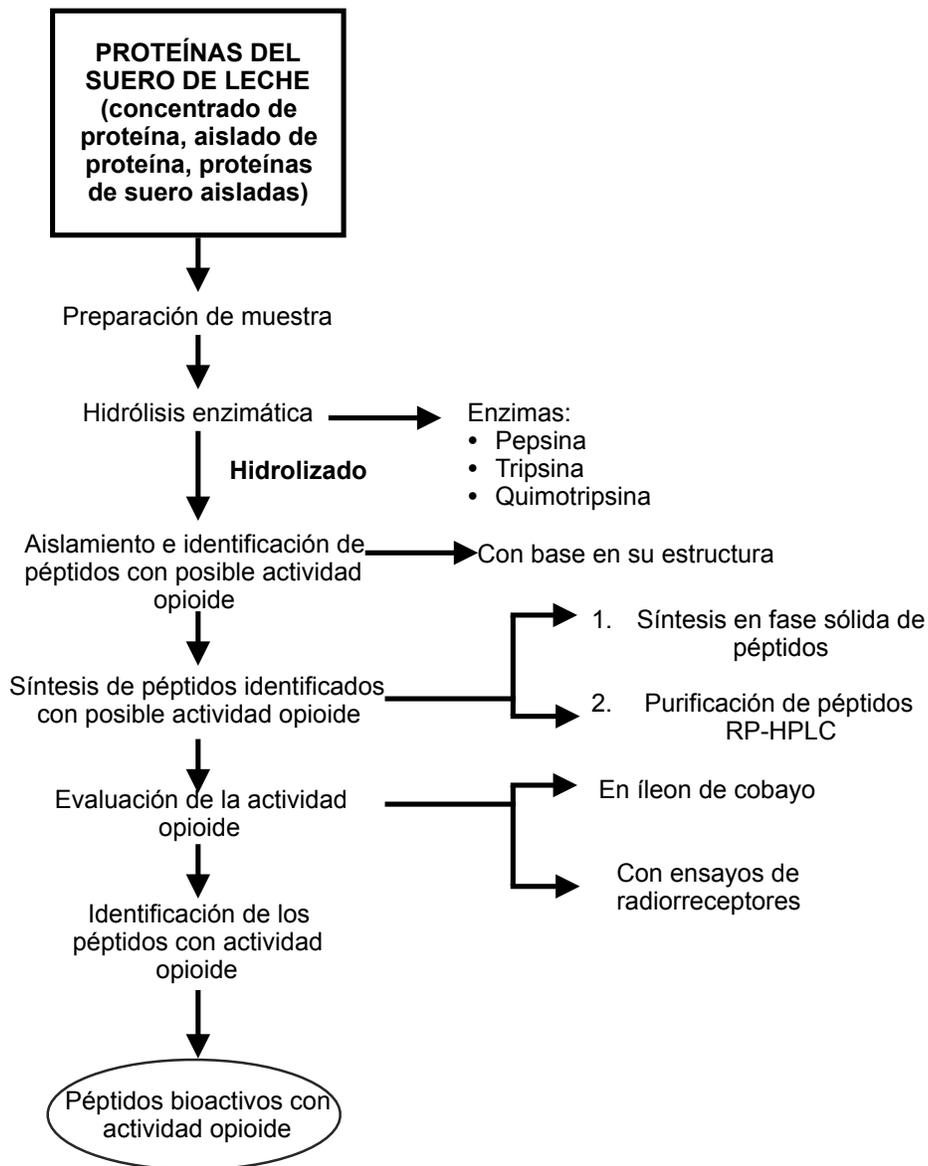


Figura 10. Proceso general para la identificación de péptidos bioactivos con actividad opioide.

(Figura basada en información de Martínez-Maqueda *et al.*, 2013)

Algunos de los péptidos identificados con esta actividad se muestran en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Péptidos provenientes de las proteínas del suero identificados con actividad opioide				
Proteína origen	Nombre	Enzima utilizada	Secuencia de Aminoácidos	Referencias
β-lactoglobulina	β-lactorfina (amida) (agonista)	tripsina	YLLF	Mullally <i>et al.</i> , 1996
	β-lactotensina	quimotripsina	HIRL	Yamauchi <i>et al.</i> , 2003
α-lactalbúmina	α-lactorfina	pepsina	YGLF	Korhonen <i>et al.</i> 1998
albúmina de suero bovino	serorfina	pepsina	YGFQDA	Korhonen <i>et al.</i> 1998
lactoferrina	lactoferroxina A	-	YLGSGY	Tani <i>et al.</i> , 1990
	lactoferroxina B		RYYGY	
	lactoferroxina C		KYLGPQY	

Algunas características de estos péptidos son las que se mencionan a continuación.

α-lactorfina:

- Agonista opioide (Masood y Khosravi-Darani, 2015).
- Estimula la secreción de la mucina y la expresión de MUC5AC; debido a su capacidad para interactuar con los receptores opioides (Martínez-Maqueda *et al.*, 2013).
- Posee actividad antihipertensiva: en ratas espontáneamente hipertensas administrado por vía subcutánea reduce la presión arterial (al inducir la liberación de monóxido de nitrógeno y, por lo tanto, a la vasorelajación), lo que sugiere que los receptores opioides (ubicados en el tracto gastrointestinal) están involucrados en la acción antihipertensiva del péptido ya que el antagonista de los receptores opioides, la naloxona, abolió el efecto (Yadav *et al.*, 2015).

β-lactorfina:

- Agonista opioide (Masood y Khosravi-Darani, 2015).
- Estimula la secreción de la mucina (Dullius *et al.*, 2018).
- Posee actividad antihipertensiva (Yadav *et al.*, 2015).

Lactoferroxina:

- Antagonista opioide (Masood y Khosravi-Darani, 2015).

En todos los procesos para la identificación de péptidos bioactivos, tras la identificación de la secuencia de los péptidos aislados, la bioactividad se valida probando los péptidos puros sintetizados químicamente (Li-Chan, 2015).

3.2. PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE LA CASEÍNA

Debido al proceso de elaboración del queso, en donde las caseínas precipitan, el contenido de éstas en el suero de leche es nulo; sin embargo, hay que recordar que el glicomacropéptido, proteína presente en el suero de leche, se deriva de la κ -caseína (Dullius *et al.*, 2018). La caseína también es una fuente rica de péptidos bioactivos, los cuales tienen diferentes efectos reguladores como (Lucarini, 2017):

- a) Transporte de minerales y aminoácidos.
- b) Transporte de fluido intestinal.
- c) Motilidad del tracto gastrointestinal.
- d) Estimulación de la secreción de hormonas postprandiales (insulina, somatostatina).
- e) Inmunoestimulante: regulación de la secreción de insulina basada en la concentración de glucosa.
- f) Antihipertensivo.
- g) Antitrombótico.
- h) Opioide.
- i) Antioxidante.
- j) Hipocolesterolémico.
- k) Antitumoral.

Es por esto que, en general, las proteínas de la leche se consideran una fuente de péptidos bioactivos.

4. APLICACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS DEL SUERO DE LECHE

Los péptidos bioactivos provenientes de las proteínas del suero de leche han demostrado tener principalmente actividad antioxidante, antihipertensiva, antimicrobiana y opioide. Además, algunos autores mencionan que también tienen actividad antitrombótica, inmunomoduladora, anticancerígena e hipocolesterolémica, sin embargo, durante la búsqueda de información no se hallaron suficientes trabajos actuales que profundicen sobre esas funciones.

Todas estas funciones encontradas en los péptidos bioactivos afectan funciones fisiológicas cruciales y modulan varios procesos reguladores en los principales sistemas corporales, como el sistema cardiovascular, digestivo, endocrino, inmunológico y nervioso, haciendo que tengan el potencial para reducir el riesgo de enfermedades crónicas y para promover la salud humana (Dullius *et al.*, 2018).

La aplicación en alimentos de estos péptidos ofrece dos tipos de beneficios:

- Beneficiar al alimento mismo como conservadores (es el caso de los péptidos bioactivos con actividad antioxidante y antimicrobiana).
- Beneficiar la salud del ser humano al consumir alimentos que los contienen (es el caso de todos los péptidos bioactivos mencionados).

Los péptidos bioactivos pueden ser utilizados para el desarrollo de alimentos funcionales. Los alimentos funcionales, nutraceúticos, productos farmacéuticos y alimentos de diseño, están hechos de ingredientes naturales y ofrecen, además de su valor nutricional (Dullius *et al.*, 2018), beneficios en una o más funciones del cuerpo, de manera que sea relevante, como una mejora del estado de salud y bienestar y/o una reducción del riesgo de ciertas enfermedades; esto también incluye la prevención y el tratamiento de enfermedades (Hernández-Rojas y Vélez-Ruiz, 2014).

En la actualidad, la producción de péptidos bioactivos del suero de leche a nivel industrial ha llevado a la comercialización de algunos ingredientes funcionales (Cuadro 10), principalmente aislados y suplementos que contienen a los péptidos, cuyo impacto en la salud se ha comprobado a partir de estudios *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, aún no se han obtenido ingredientes funcionales que contengan exclusivamente a los péptidos bioactivos, ya que su producción no es económicamente viable debido a los procesos de purificación necesarios, desacelerando el desarrollo de productos que los contengan (Dullius *et al.*, 2018).

Cuadro 10. Ingredientes funcionales con péptidos bioactivos de las proteínas del suero de leche				
<i>Nombre del Producto</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Tipo de producto</i>	<i>Bioactividad peptídica</i>	<i>Impacto en la salud</i>
BioZate®	Davisco, EUA	Aislado de proteína de suero de leche hidrolizado	Fragmentos de β -lactoglobulina	Reducción de la presión sanguínea
BioPureGMP™	Davisco, EUA	Aislado de proteína de suero de leche	Glicomacropéptido f (106 - 169)	Prevención de caries, coagulación de la sangre, antimicrobiano, antivirus
Vivinal® ALPHA	Borculo Domo Ingredients (BDI), Países Bajos	Ingrediente/hidrolizado	Péptidos derivados del suero de leche	Relajación y sueño
Praventin™	DMV International, Países Bajos	Suplemento alimenticio/cápsulas	Lactoferrina enriquecida con hidrolizado de proteína de suero de leche	Reducción de acné
Dermylex™	Advitec, Inc., Canadá	Suplemento alimenticio/tabletas	Extracto XP-828L de proteína de suero de leche	Reduce los síntomas de la psoriasis
Hilmar™8390	Hilmar Ingredients, EUA	Suplemento alimenticio	Hidrolizado de proteínas de suero de leche	Inhibición de la ECA
NOP-47™	Glanbia Nutritionals, EUA	Suplemento alimenticio y aplicaciones farmacéuticas	Péptidos derivados del suero de leche	Propiedades antiinflamatorias

(Cuadro basado en información de Dullius *et al.*, 2018)

En el mercado se pueden encontrar 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 ha logrado 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. Ejemplo de esto son los productos lácteos fermentados registrados como CALPIS®, comercializado en Japón, y EVOLUS®, comercializado en Finlandia, que contienen péptidos con actividad antihipertensiva comprobada (Jakopovic *et al.*, 2019). Ambos tienen péptidos bioactivos derivados de la caseína de la leche, lo cual remarca el potencial que se puede alcanzar con los péptidos bioactivos del suero de leche al incorporarlos en una matriz alimentaria.

Otro ejemplo, es la gama de productos alimentarios a base de péptidos Peptamen® de Nestlé, fórmulas completas con proteína de suero de leche hidrolizada, específicamente diseñadas para satisfacer los requerimientos nutricionales específicos de pacientes desnutridos o en riesgo nutricional con alteraciones de la absorción y/o de la digestión. Son fórmulas de alta tolerancia que pueden ayudar a la pronta recuperación de los pacientes (Nestlé *Health Science*, 2019).

Con esto se remarca que el mercado de péptidos bioactivos del suero de leche aún es muy pequeño y esto debe a que para la aplicación industrial y la incorporación de péptidos bioactivos en los alimentos, se deben tomar en cuenta diferentes aspectos que hasta ahora se consideran más como limitantes:

- Procesos de producción de péptidos bioactivos

Los procesos de producción tienen un impacto en la pureza de los péptidos bioactivos y los costos. Los procesos que influyen en la pureza son: el tratamiento previo y la hidrólisis enzimática controlada, los cuales aumentan la liberación específica de péptidos bioactivos particulares; la purificación, que debe realizarse en condiciones suaves para evitar afectar la estructura y función de los péptidos (Dullius *et al.*, 2018);

la combinación de métodos para producir, separar, purificar e identificar los péptidos bioactivos, que conducen a productos de alta pureza y/o rendimiento. En cuanto a costos el fraccionamiento y la purificación pueden representar hasta el 70% del capital y las condiciones operativas (Sibel, 2014).

Además, hasta hace poco, la producción comercial de péptidos bioactivos se ha visto limitada por la falta de tecnologías adecuadas a gran escala. Es por esto que lograr un flujo de procesos más sistemático en el desarrollo de productos que se pueda ampliar de forma rentable a una producción industrial es de los principales desafíos en este campo, y superar estos obstáculos ha llevado a una reorganización de los procesos convencionales posteriores que requieren la integración de métodos híbridos (Dullius *et al.*, 2018).

- Sabor amargo y estabilidad de los péptidos bioactivos

El problema de la superación del sabor amargo provocado por estos péptidos, así como el mantenimiento de su estabilidad, son aspectos que deben resolverse al tiempo que se mantienen unas condiciones de producción rentables (Dullius *et al.*, 2018). La (micro o nano) encapsulación ha surgido como una estrategia para enmascarar el sabor amargo que provocan los péptidos, así como para mejorar su estabilidad en diversos productos alimentarios y durante la digestión (Sibel, 2014).

Por otro lado, a pesar de que las proteínas hidrolizadas tienen un potencial antigénico bajo, debido a la destrucción de áreas antigénicas determinantes durante la hidrólisis, una de las principales propiedades que se debe controlar, es la antigenicidad residual, esta se refiere a la cantidad de proteína no disuelta que retiene la capacidad de interactuar con los anticuerpos y ser perjudicial para la salud, esta propiedad no se reporta en los estudios que se enfocan exclusivamente en la identificación de péptidos bioactivos pero, son de suma importancia cuando su propósito es para el consumo humano (Evdokimov *et al.*, 2015).

- Implicaciones en el uso de péptidos bioactivos

Aunque ya hay un desarrollo en la producción de péptidos bioactivos, aún existen varios obstáculos que limitan su rápida expansión y aplicación en una matriz alimentaria. Los obstáculos incluyen la falta de estudios en humanos que muestren sus efectos benéficos; la insuficiente evidencia científica *in vivo*, de cada una de sus actividades, sobre sus mecanismos de acción, sus efectos adversos y la relación dosis-respuesta; la falta de datos científicos sobre sus interacciones con medicamentos en el cuerpo humano y con los otros constituyentes presentes en un alimento funcional y la ausencia de estudios científicos relacionados con su absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME). Además, para su uso debe garantizar la seguridad, así como cumplir con las regulaciones establecidas en cada país (Chalamaiah *et al.*, 2019).

El alto costo que representa la aplicación de péptidos bioactivos en la industria es uno de los mayores problemas, es por esto, que existe la necesidad de metodologías de producción a gran escala para garantizar material suficiente para estudios *in vivo* y formulaciones de alimentos. Por lo tanto, se requieren más estudios tecnológicos para establecer condiciones experimentales para alcanzar mayores rendimientos de estas moléculas bioactivas (Brandelli *et al.*, 2015). También, la purificación de péptidos bioactivos por métodos cromatográficos es costo-prohibida para el enriquecimiento de péptidos en la industria alimentaria, impidiendo su uso en la producción a gran escala. Enfoques *in silico* pueden ayudar a superar los desafíos de los péptidos de laboratorio que requieren mucho tiempo y costo (Dullius *et al.*, 2018).

A pesar de todas estas limitantes, el desarrollo continuo en las últimas dos décadas de tecnologías para la producción de ingredientes que contienen péptidos bioactivos de suero a escala industrial ha dado como resultado varios productos en el mercado internacional (Cuadro 10). Con respecto a la producción industrial de ingredientes alimentarios a base de péptidos la ultrafiltración y nanofiltración son los únicos métodos que enriquecen los ingredientes alimentarios, como los hidrolizados de suero, con

péptidos bioactivos de una manera económicamente viable (Dullius *et al.*, 2018).

Actualmente se han formado bases de datos sobre péptidos bioactivos para almacenar información como la secuencia, el peso molecular, la actividad, las referencias al trabajo publicado, etc.; ejemplos de estas son (Sibel, 2014):

- BioPep: base de datos que contiene información especialmente sobre péptidos bioactivos.
- Base de datos de péptidos antimicrobianos (APD, *Antimicrobial Peptide Database*, por sus siglas en inglés) es otra base de datos de péptidos antimicrobianos naturales con menos de 100 residuos de aminoácidos.

Además de la aplicación de péptidos en la industria alimentaria, también se ha abierto su aplicación en el campo farmacéutico. Por ejemplo, los péptidos antimicrobianos pueden actuar como alternativas a los fármacos de moléculas pequeñas. Ofrecen ventajas tales como alta bioactividad y bioespecificidad, amplios espectros para acción terapéutica, bajos niveles de toxicidad, diversidad estructural y ausencia o bajos niveles de acumulación en tejidos corporales. Los péptidos antimicrobianos han sido declarados una prometedora alternativa a los antibióticos actuales. En comparación con los antibióticos, los péptidos antimicrobianos tienen la ventaja de inactivar a las células objetivo rápidamente y un amplio espectro de actividad, incluida la actividad hacia algunos patógenos resistentes a los antibióticos de interés sanitario. Además, dado que la tasa de mortandad con péptidos es mayor que la tasa de multiplicación bacteriana, el potencial para superar la resistencia a los fármacos es mayor (Sibel, 2014).

Todos estos trabajos demuestran el gran potencial que tiene el uso de las proteínas del suero de leche. Como lo mencionan muchos de estos autores, todavía queda mucho trabajo de investigación por desarrollar. A medida que se tenga más conocimiento, se motivará a la industria a la producción de alimentos funcionales a base de péptidos bioactivos de las proteínas del suero de leche y a introducir en el mercado alternativas más saludables para el consumidor.

5. CONCLUSIONES

Poco más de la mitad de los nutrientes originales de la leche se fraccionan en el suero lácteo durante el proceso de elaboración de quesos, que si bien son altamente contaminantes cuando no se disponen de manera adecuada, representan una valiosa fuente de proteínas, no sólo por sus propiedades funcionales y su valor nutricional, sino por su actividad biológica encriptada en su estructura primaria.

Se documentó la problemática del suero de leche como material contaminante, del aprovechamiento de las proteínas de suero y en particular, sobre la más reciente evidencia científica de los péptidos con actividad antioxidante, antihipertensiva, antimicrobiana y opioide.

Los procesos de producción de péptidos bioactivos, a partir de concentrados o aislados de las proteínas de suero de leche, coinciden básicamente en las siguientes etapas: (1) hidrólisis enzimática, (2) fraccionamiento o purificación, (3) medición de la bioactividad de interés, (4) selección de las fracciones con mayor bioactividad, y (5) identificación de las secuencias de aminoácidos.

Si bien la producción de péptidos bioactivos puros no es económicamente viable, actualmente se comercializan ingredientes funcionales con hidrolizados de las proteínas de suero.

El mercado de péptidos bioactivos del suero de leche aún es reducido y su aplicación en una matriz alimentaria debe considerar la reducción de los costos de producción y purificación, estudios de estabilidad, reducción o eliminación del sabor amargo y posibles efectos adversos.

Es necesario realizar mayor investigación que permita la obtención de alimentos con péptidos bioactivos y estudios clínicos en los que se demuestre sus supuestos beneficios a la salud de quien los consume.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Hamid, M., Osman, A., Badran, S.M., Goda, H.A., Otte, J. (2015). Antibacterial peptides generated by alcalase hydrolysis of goat whey. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 480-486.
- Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. Itoh, T. (1998). Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *Journal of Dairy Science*, 81, 3131-3138.
- Agadi, N., Vasudevan, S., Kumar, A. (2018). Structural insight into the mechanism of action of antimicrobial peptide BMAP-28(1-18) and its analogue *mut*BMAP18. *Journal of Structural Biology*, 204, 435-448.
- Amin, F., Khan, W., Bano, B. (2019). Oxidation of cystatin imparted by riboflavin generated free radicals: Spectral analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124, 1281-1291.
- Arora, P.K. y Chauhan, A. (2013). ACE inhibitors: A comprehensive review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(2), 532-548.
- Arrutia, F., Puente, Á., Riera, F.A., Menéndez, C., González, U.A. (2016). Influence of heat pre-treatment on BSA tryptic hydrolysis and peptide release. *Food Chemistry*, 202, 40-48.
- Artica, L.M. 2014. *Métodos para el Análisis Fisicoquímico de la Leche y Derivados Lácteos*. Segunda edición. Perú: Libros y Editoriales TEIA.
- Athira, S., Mann, B., Saini, P., Sharma, R., Kumar, R., Singh, A.K. (2015). Production and characterisation of whey protein hydrolysate having antioxidant activity from cheese whey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(14), 2908-2915.
- Aune, D., Keum, N., Giovannucci, E., Fadnes, L.T., Boffetta, P., Greenwood, D.C., Tonstad, S., Vatten, L.J., Riboli, E., Norat, T. (2018). Dietary intake and blood concentrations of antioxidants and the risk of cardiovascular disease, total cancer, and all-cause mortality: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 108, 1069-1091.
- Badui, S. 2013. *Química de los Alimentos*. Quinta edición. México: Pearson Educación.
- Baldasso, C., Barros, T.C., Tessaro, I.C. (2011). Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination*, 278, 381-386.

- Bansal, N. y Bhandari, B. 2016. Functional milk proteins: Production and utilization – whey based ingredients. En: P. Mcsweeney y J. O'Mahony. Eds. *Advanced Dairy Chemistry Volume 1B: Proteins*. Nueva York: Springer, 3.
- Barać, M., Pešić, M., Vučić, T., Vasić, M., Smiljanić, M. (2017). White cheeses as a potential source of bioactive peptides. *Mljekarstvo*, 67(1), 3-16.
- Belén, F., Raventós, M., Hernández, E. (2018). Management of cheese whey by film freeze concentration. *Environmental Engineering and Management Journal*, 17(6), 1373-1383.
- Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P. 2009. *Food Chemistry*. Cuarta edición. Heidelberg: Springer.
- Bodnarchuk, V., Zhukova, F., Oliinichenko, V. (2015). Variance of sour and sweet cream butter organoleptic. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*, 7(4), 74-82.
- Brandelli, A., Daroit, D.J., Corrêa, A.P.F. (2015). Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Research International*, 73, 149-161.
- Brown, T.L., LeMay, H.E., Bursten, B.E., Murphy, C.J. 2013. *Química la Ciencia Central*. Doceava edición. México: Pearson Educación.
- Cais-Sokolińska, D., y Rudzińska, M. (2018). Short communication: Cholesterol oxidation products in traditional buttermilk. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3829-3834.
- Carvalho, F., Prazeres, A.R., Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of the Total Environment*, 445-446, 385-396.
- Chacón-Gurrola, L.R., Chávez-Martínez, A., Rentería-Monterrubio, A.L., Rodríguez-Figueroa, J.C. (2017). Proteínas del lactosuero: Usos, relación con la salud y bioactividades. *Interciencia*, 42(11), 712-718.
- Chalamaiah, M., Ulug, S.K., Hong, H., Jianping, Wu. (2019). Regulatory requirements of bioactive peptides (protein hydrolysates) from food proteins. *Journal of Functional Foods*, 58, 123-129.

- Chen, F., Chen, B., Guan, W., Chen, J., Lv, Y., Qiao, H., Wang, C., Zhang, Y. (2017). Metabolic transition of milk lactose synthesis and up-regulation by AKT1 in sows from late pregnancy to lactation. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 483, 131-138.
- Cheung, P. 2015. *Handbook of Food Chemistry*. Heidelberg: Springer.
- Comisión Nacional del Agua. 2017. *Estadísticas del agua en México*. Edición 2017. México: CONAGUA.
- Comisión Nacional del Agua. 2018. *Estadísticas del agua en México*. Edición 2018. México: CONAGUA.
- Conway, V., Gauthier, S.F., Pouliot, Y. (2010). Effect of cream pasteurization, microfiltration and enzymatic proteolysis on in vitro cholesterol-lowering activity of buttermilk solids. *Dairy Science & Technology*, 90(4), 449-460.
- Conway, V., Gauthier, S. F., Pouliot, Y. (2014). Buttermilk: Much more than a source of milk phospholipids. *Animal Frontiers*, 4(2), 44-51.
- Córdova-Dávalos, L.E., Jiménez, M., Salinas, E. (2019). Glycomacropeptide bioactivity and tealth: A review. *Nutrients*, 11, 2-22.
- Čurda, L., Korhonen, H.J.T., Pihlanto, A., Marnila, P., Dryáková, A. (2010). Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. *European Food Research and Technology*, 230(6), 865-874.
- Daskaya-Dikmen, C., Yucetepe, A., Karbancioglu-Guler, F., Daskaya, H., Ozcelik, Beraat. (2017). Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides from plants. *Nutrients*, 9(316), 1-19.
- del Mar Contreras, M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Martín-Álvarez, P. J., Recio, I. (2011). Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 44(1), 9-15.
- Demers-Mathieu, V., Gauthier, S.F., Britten, M., Fliss, I., Robitaille, G., Jean, J. (2013). Antibacterial activity of peptides extracted from tryptic hydrolyzate of whey protein by nanofiltration. *International Dairy Journal*, 28(2), 94-101.
- Dullius, A., Goettert, M.I., de Souza, C.F.V. (2018). Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods - Biotechnological facilitation of industrial scale-up. *Journal of Functional Foods*, 42, 58-74.

- Edwards, P.J.B. y Jameson, G.B. 2014. Structure and stability of whey proteins. En: H. Singh, M. Boland, A. Thompson. Eds. *Milk proteins: From expression to food*. Segunda edición. California: Elsevier, 7.
- Evdokimov, I., Kurchenko, V., Tsigankov, V., Golovach, T. (2015). Determination of physicochemical, immunochemical and antioxidant properties, toxicological and hygienic assessment of whey protein concentrate and its hydrolysate. *Foods and Raw Materials*, 3(2), 105-114.
- Fox, P.F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P.L.H., O'Mahony, J.A. 2015. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Segunda edición. Nueva York: Springer.
- Guerrero-Rodríguez, W.J., Castilla-Hernández, D.P., Gómez-Aldapa, C.A., Cárdenas-Medina, K.N., Castro-rosas, J. (2012). Degradación anaerobia de dos tipos de lactosuero en reactores UASB. *Tecnología Química*, 32(1), 115-125.
- Guimarães, P.M.R., Teixeira, J.A., Domingues, L. (2010). Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*, 28(3), 375-384.
- Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 588-593.
- Hernández-Ledesma, B., del Mar Contreras, M., Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 23-35.
- Hernández-Ledesma, B., Miguel, M., Amigo, L., Aleixandre, M. A., Recio, I. (2007). Effect of simulated gastrointestinal digestion on the antihypertensive properties of synthetic beta-lactoglobulin peptide sequences. *Journal of Dairy Research*, 74(3), 336-339.
- Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Gómez-Ruiz, J.Á. (2011). Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. *Small Ruminant Research*, 101, 196-204.
- Hernández-Rojas, M. y Vélez-Ruíz, J.F. (2014). Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(2), 13-22.

- Holland, J.W. y Boland, M.J. 2014. Post-translational Modifications of Caseins. En: H. Singh, M. Boland, A. Thompson. Eds. *Milk proteins: From expression to food*. Segunda edición. California: Elsevier, 5.
- Holzmüller, W., y Kulozik, U. (2016). Quantification of MFGM proteins in buttermilk and butter serum by means of a stain free SDS-PAGE method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 49, 102–109.
- Hsu, K-C., Tung, Y-S., Huang, S-L., Jao, C-L. 2013. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of peptides. En: B. Hernández-Ledesma y C-C. Hsieh. Eds. *Bioactive food peptides in health and disease*. Rijeka: IntechOpen, 8.
- Jakopovic, K.L., Barukcic, I., Bozanic, R. (2019). Bioactive components derived from bovine milk. *Mljekarstvo*, 69(3), 151-161.
- Jauhiainen, T. y Korpela, R. (2018). Milk peptides and blood pressure. *The Journal of Nutrition*, 137(3), 825-829.
- Khan, M.U., Pirzadeh, M., Förster, C.Y., Shityakov, S., Shariati, M.A. (2018). Role of milk-derived antibacterial peptides in modern food biotechnology: their synthesis, applications and future perspectives. *Biomolecules*, 8(110), 1-16.
- Khattab, A.R., Guirguis, H.A., Tawfik, S.M., Farag, M.A. (2019). Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 343-360.
- Korhonen, H., Pihlanto-Leppälä, A., Rantamaki, P., Tupasela, T. (1998). The functional and biological properties of whey proteins: Prospects for the development of functional foods. *Agriculture and Food Science in Finland*, 7, 283-296.
- Kumar, S., Sharma, S., Vasudeva, N. (2017). Review on antioxidants and evaluation procedures. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 91, 1-12.
- Lambert, S., Leconte, N., Blot, M., Rousseau, F., Robert, B., Camier, B., Gassy, J., Cauty, C., Lopez, C., Gésan-guizou, G. (2016). The lipid content and microstructure of industrial whole buttermilk and butter serum affect the efficiency of skimming. *Food Research International*, 83, 121-130.
- Lee, J. y Martini, S. (2018). Effect of cream aging temperatura and agitation on butter properties. *Journal of Dairy Science*, 101, 7724-7735.

- Li-Chan, E.C.Y. (2015). Bioactive peptides and protein hydrolysates: Research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Current Opinion in Food Science*, 1(1), 28-37.
- Lucarini, M. (2017). Bioactive peptides in milk: From encrypted sequences to nutraceutical aspects. *Beverages*, 3(4), 41.
- Macwan, S.R., Dabhi, B.K., Parmar, S.C., Aparnathi, K.D. (2016). Whey and its utilization. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(8), 134-155.
- Maibom-Thomsen, S. L., Trier, N. H., Holm, B. E. (2019). Immunoglobulin G structure and rheumatoid factor epitopes. *Plos One*, 14, 1-29.
- Malik, E., Dennison, S.R., Harris, F., Phoenix, D.A. (2016). pH dependent antimicrobial peptides and proteins, their mechanisms of action and potential as therapeutic agents. *Pharmaceuticals*, 9(67), 1-35.
- Marengo, M., Miriani, M., Ferranti, P., Bonomi, F., Iametti, S., Barbiroli, A. (2016). Structural changes in emulsion-bound bovine beta-lactoglobulin affect its proteolysis and immunoreactivity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1864, 805-813.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Ramos, M., Recio, I. (2013). Effect of β -lactoglobulin hydrolysate and β -lactorphin on intestinal mucin secretion and gene expression in human goblet cells. *Food Research International*, 54(1), 1287-1291.
- Masood, R. y Khosravi-Darani, K. (2015). Biopeptides in milk: Opiate and antithrombotic effects. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 15(10), 872-877.
- Morais, H.A., Silvestre, M.P.C., Gonçalves, J.H.T., Silva, M.R., Monteiro, M.R.P. (2018). Correlations between the peptide profile and the antioxidant and the ACE inhibitory activities of whey protein concentrate hydrolysates. *Scientific Electronic Archives*, 11(3), 122-127.
- Morillo, O.T., Guerrero-Cardena, B.R., García-Lugo, P.J., Castañeda-Ruiz, R., Torres-Vielma, Y. (2015). Evaluación de la producción experimental de enzimas coagulantes de leche utilizando cepas de *Rhizomucor* spp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(1), 54-60.

- Mullally, M.M., Meisel, H., FitzGerald, R.J. (1996). Synthetic peptides corresponding to α -lactalbumin and β -lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 377, 259-260.
- Mullally, M.M., Meisel, H., FitzGerald, R.J. (1997). Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine beta-lactoglobulin. *FEBS Letters*, 402, 99-101.
- Murata, M., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Abe, F. (2013). Identification of milk proteins enhancing the antimicrobial activity of lactoferrin and lactoferricin. *Journal of Dairy Science*, 96(8), 4891-4898.
- Nestlé Health Science, 2019. Peptamen® Fórmulas peptídicas. [En línea]. Disponible en: <https://www.nestlehealthscience.es/marcas/peptamen/home> [Último acceso el 27 de marzo de 2019].
- Nguyen, L.T., Haney, E.F., Vogel, H.J. (2011). The spanning scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 464-472.
- Norma Mexicana NMX-AA-028-SCFI-2001. Análisis de agua - determinación de la demanda bioquímica de oxígeno en aguas naturales, residuales (DBO₅) y residuales tratadas - Método de prueba. [En línea]. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166771/NMX-AA-028-SCFI-2001.pdf> [Último acceso el 9 de julio de 2019].
- Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2012. Leche - Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. [En línea]. Disponible en: <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4692/seeco/seeco.htm> [Último acceso el 27 de marzo de 2019].
- Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones, especificaciones sanitarias y Métodos de prueba. [En línea]. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5160755&fecha=27/09/2010 [Último acceso el 27 de marzo de 2019].

- Nurminen, M.L., Sipola, M., Kaarto, H., Pihlanto-Leppälä, A., Piilola, K., Korpela, R., Tossavainen, O., Korhonen, H., Vapaatalo, H. (2000). Alpha-lactorphin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Science*, 66, 1535-1543.
- O'Mahony, J. A. y Fox, P. F. 2013. Milk proteins and historical aspects. En: P. Mcsweeney y P. Fox. Eds. *Advanced dairy chemistry volume 1A: Proteins*. Cuarta edición. Nueva York: Springer, 2.
- O'Mahony, J. A. y Fox, P. F. 2014. Milk: An Overview. En: H. Singh, M. Boland, A. Thompson. Eds. *Milk proteins: From expression to food*. Segunda edición. California: Elsevier, 2.
- Organización Mundial de la Salud, 2019. Enfermedades cardiovasculares. [En línea]. Disponible en: https://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/es/ [Último acceso el 24 de febrero de 2019].
- Otte, J., Shalaby, S.M.A., Zakora, M., Nielsen, M.S. (2007). Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from α -lactalbumin and β -casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. *International Dairy Journal*, 17(12), 1460-1472.
- Pan, D. y Guo, Y. (2010). Optimization of sour milk fermentation for the production of ACE-inhibitory peptides and purification of a novel peptide from whey protein hydrolysate. *International Dairy Journal*, 20, 472-479.
- Paredes, P., Chávez, A., Rodríguez, J.C., Aguilar, N., Rentería, A.L., Rodríguez, G. (2015). Características fisicoquímicas y microbiológicas de suero de leche de queso Chihuahua. *Investigacion y Ciencia*, 22,11-16.
- Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U., Hunziker, P. (2001). Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1526(2), 131-140.
- Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Hunziker, P., von Fellenberg, R. (1999). Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine α -lactalbumin molecule. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1426(3), 439-448.

- Peng, X., Kong, B., Xia, X., Liu, Q. (2010). Reducing and radical-scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with alcalase. *International Dairy Journal*, 20(5), 360-365.
- Pereira, P.C. (2014). Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, 30(6), 619-627.
- Pihlanto-Leppälä, A. (2002). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 11(9-10), 347-356.
- Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T., Korhonen, H. (2000). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digest: Concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research*, 67, 53-64
- Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T., Korhonen, H. (1998). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International Dairy Journal*, 8, 325-331.
- Poveda, E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista Chilena de Nutrición*, 40(397), 397-403.
- Power, O., Fernández, A., Norris, R., Riera, F.A., FitzGerald, R.J. (2014). Selective enrichment of bioactive properties during ultrafiltration of a tryptic digest of β -lactoglobulin. *Journal of Functional Foods*, 9, 38-47.
- Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48-68.
- Ramírez-López, C. y Vélez-Ruiz, J.F. (2012). Quesos frescos: Propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2), 131-148.
- Rao, E., Foderà, V., Leone, M., Vetri, V. (2019). Direct observation of alpha-lactalbumin, adsorption and incorporation into lipid membrane and formation of lipid/protein hybrid structures. *BBA-General Subjects*, 1863(5), 784-794.
- Recio, I., Pintado, M.E., Martín-Álvarez, P.J., Malcata, F.X., Amorim, M., Tavares, T.G., Contreras, M.M. (2011). Optimisation, by response surface methodology, of degree of hydrolysis and antioxidant and ACE-inhibitory activities of whey protein

- hydrolysates obtained with cardoon extract. *International Dairy Journal*, 21(12), 926-933.
- Reihani, S.F.S. y Khosravi-Darani, K. (2019). Influencing factors on single-cell protein production by submerged fermentation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 37, 34-40.
- Reyes-Jurado, F., Palou, E., López-Malo, A. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(1), 68-78.
- Ritota, M., Di Costanzo, M.G., Mattera, M., Manzi, P. (2017). New trends for the evaluation of heat treatments of milk. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2017, 1-12.
- Rønholt, S., Mortensen, K., Knudsen, J.C. (2013). The effective factors on the structure of butter and other milk fat-based products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, 468-482.
- Rybak O. (2016). Milk fat in structure formation of dairy products: a review. *Ukrainian Food Journal*, 5(3), 499-514.
- Sadat, L., Cakir-Kiefer, C., Marie-Andree, M., Gaillard, J., Girardet, J., Miclo, L. (2011). Isolation and identification of antioxidative peptides from bovine α -lactalbumin. *International Dairy Journal*, 21, 214-221.
- Sah, B.N.P., Vasiljevic, T., McKechnie, S., Donkor, O.N. (2018). Antioxidative and antibacterial peptides derived from bovine milk proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(5), 726-740.
- Sánchez-Mendoza, N.A., Cruz-Castellanos, M., Dávila-Ortiz, G., Jiménez-Martínez, C. 2016. Péptidos con actividad antioxidante provenientes de fuentes animales y vegetales. En: M.E. Ramírez-Ortiz. Ed. *Alimentos funcionales de hoy*. Barcelona: OmniaScience, 5.
- Sarmadi, B.H. e Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956.
- Segalin, J., Fontoura, R., Meira, S.M.M., Corrêa, A.P.F., Brandelli, A., Daroit, D.J. (2014). Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with

- antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Peptides*, 61, 48-55.
- Sharma, R., Mahboob, S., Prajapati, K., Kumar, R., Kumari, A., Athira, S., Mann, B. (2014). Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 3235-3241.
- Sibel, A. (2014). Dairy-derived antimicrobial peptides: Action mechanisms, pharmaceutical uses and production proposals. *Trends in Food Science and Technology*, 36(2), 79-95.
- Silvestre, M.P.C., Afonso, W. de O., Souza, M.W.S. de, Lopes-Junior, C. de O., Silva, M.R., Silva, V.D.M. (2013). Analysis of whey protein hydrolysates: peptide profile and ACE inhibitory activity. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(4), 747-757.
- Smithers, G. W. (2015). Whey-ing up the options - Yesterday, today and tomorrow. *International Dairy Journal*, 48, 2-14.
- Soodam, K., y Guinee, T.P. (2018). The case for milk protein standardisation using membrane filtration for improving cheese consistency and quality. *International Journal of Dairy Technology*, 71(2), 277-292.
- Stefanucci, A., Mollica, A., Macedonio, G., Zengin, G., Ahmed, A.A., Novellino, E. (2018). Exogenous opioid peptides derived from food proteins and their possible uses as dietary supplements: A critical review. *Food Reviews International*, 34(1), 70-86.
- Tani, F., Iio, K., Chiba, H., Yoshikawa, M. (1990). Isolation and characterization of opioid antagonist peptides derived from human lactoferrin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(7), 1803-1810.
- Tavares, T., Contreras, M.M., Amorim, M., Pintado, M., Recio, I., Malcata, F.X. (2011). Novel whey-derived peptides with inhibitory effect against angiotensin-converting enzyme: In vitro effect and stability to gastrointestinal enzymes. *Peptides*, 32, 1013-1019.
- The Protein Data Bank. Qin, B.Y., Bewley, M.C., Creamer, L.K., Baker, H.M., Baker, E.N., Jameson, G.B. (1998). *Structural basis of the Tanford transition of bovine*

beta-lactoglobulin, 37, 14014–14023. Disponible en: <http://www.rcsb.org/structure/2Q2M> [Último acceso el 1 de mayo de 2019].

- Théolier, J., Hammami, R., Labelle, P., Fliss, I., Jean, J. (2013). Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 706–714.
- Tirado-Armesto, D.F., Gallo-García, L.A., Acevedo-Correa, D., Mouthon-Bello, J. A. (2016). Biotratamientos de aguas residuales en la industria láctea. *Producción + Limpia*, 11(1), 171-185.
- van Elswijk, D.A., Diefenbach, O., van der Berg, S., Irth, H., Tjaden, U.R., van Der Greef, J. (2003). Rapid detection and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitors by on-line liquid chromatography-biochemical detection, coupled to electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1020, 45-58.
- Vanderghem, C., Bodson, P., Danthine, S., Paquot, M., Deroanne, C., Blecker. (2010). Milk fat globule membrane and buttermilk: From composition to valorization. *Biotechnology Agronomic Society Environment*, 14(3), 485-500.
- Varnava, K., y Sarojini, V. (2019). Making solid-phase peptide synthesis greener: A review of the literature. *Chemistry an Asian Journal*, 14, 1088-1097.
- Wang, C., Jiang, L., Zhang, R., Du, M., Liu, H., Chen, C., Lu, W., Tu, M. (2018). Identification of a novel ACE-inhibitory peptide from casein and evaluation of the inhibitory mechanisms. *Food Chemistry*, 256, 98-104.
- Welsh, G., Ryder, K., Brewster, J., Walker, C., Mros, S., Bekhit, A.E.D.A., McConnell, M., Carne, A. (2017). Comparison of bioactive peptides prepared from sheep cheese whey using a food-grade bacterial and a fungal protease preparation. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 1252-1259.
- Wimley, W. C., y Hristova, K. (2011). Antimicrobial peptides: Successes, challenges and unanswered questions. *Journal of Membrane Biology*, 239, 27-34.
- Yadav, J.S.S., Pilli, S., Kumar, L., Yan, S., Surampalli, R.Y., Tyagi, R.D. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 33(6), 756-774.
- Yamauchi, R., Ohinata, K., Yoshikawa, M. (2003). Beta-lactotensin and neurotensin rapidly reduce serum cholesterol via NT2 receptor. *Peptides*, 24, 1955-1961.

Zhang, Q.X., Wu, H., Ling, Y.F., Lu, R.R. (2013). Isolation and identification of antioxidant peptides derived from whey protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and Q-TOF MS. *Journal of Dairy Research*, 80(3), 367-373.