

BIOPÉPTIDOS EN LA LECHE Y SUS DERIVADOS: FUNCIONAMIENTO Y BENEFICIOS A LA SALUD

Bioactive peptides in milk and their derivatives: functionality and health benefits

Gabriela Rodríguez-Hernández, Ana Luisa Rentería-Monterrubio, José Carlos Rodríguez-Figueroa, *América Chávez-Martínez

Facultad de Zootecnia y Ecología, Universidad Autónoma de Chihuahua. Periférico Francisco R. Almada, Km 1 de la Carretera Chihuahua-Cuauhtémoc. Chihuahua, Chih., México, 31031. Teléfono: (614) 434-0303.

*amchavez@uach.mx

Artículo de revisión recibido: 21 de julio de 2013, **aceptado:** 22 de enero de 2014

RESUMEN. La leche y los productos lácteos son fuente de proteínas de alto valor biológico. Algunas de éstas presentan actividades biológicas, nutricionales y funcionales en el ser humano. En los últimos años se ha reportado que los péptidos, derivados de las proteínas lácteas, son capaces de influir positivamente en la salud del consumidor. Sin embargo, éstos no ejercen beneficio alguno, más allá del aporte nutricional, cuando forman parte de las proteínas lácteas nativas, por lo que es necesario someter a las proteínas a procesos de hidrólisis enzimática. Este proceso puede llevarse a cabo por los microorganismos propios de la leche o por aquellos que son inoculados durante la elaboración y por la adición de enzimas comerciales utilizadas durante el procesado. Cabe señalar que el efecto hidrolítico no se limita a la elaboración de los productos lácteos, sino que continúa durante la maduración y la vida en el anaquel. Así mismo, diversas investigaciones han evidenciado que la actividad de las enzimas gastrointestinales es determinante en la hidrólisis que experimentan las proteínas lácteas. De tal forma que la liberación de los péptidos, aunada al tamaño, hidrofobicidad y secuencia de los mismos constituyen requisitos indispensables para convertirlos en péptidos con actividad biológica. Éstos últimos, también considerados como péptidos bioactivos o biopéptidos, han despertado recientemente el interés de los investigadores debido a que pueden influenciar favorablemente las funciones que llevan a cabo los sistemas inmune, gastrointestinal, nervioso y cardiovascular impactando la salud del consumidor. En esta revisión de literatura, se abordaron los mecanismos por los cuales son generados los biopéptidos derivados de proteínas lácteas y los efectos fisiológicos que producen.

Palabras clave: Hidrólisis, biopéptidos, proteínas lácteas, salud.

ABSTRACT. Milk and dairy products are sources of highly valuable biological proteins. Some of these have biological, nutritional and functional activities in humans. In recent years, it has been reported that peptides derived from milk proteins, are able to positively influence the health of consumers. However, they do not exert any benefit beyond the contribution of nutrition when they are part of the native milk proteins, so it is necessary to subject proteins to enzymatic hydrolysis. This process can be carried out by the native milk microorganisms or by those who are inoculated during processing and by the addition of commercial enzymes during processing. Note that the hydrolytic effect is not limited to the production of dairy products, but it continues during ripening and shelf life. Also, several studies have shown that the activity of gastrointestinal enzymes is determinant in undergoing hydrolysis of milk proteins. Such that the release of the peptide, coupled the size, hydrophobicity and sequence are prerequisites to become biologically active peptides. The latter, also considered as bioactive peptides or biopeptides have recently attracted the interest of researchers because they can favorably influence the functions carried out by the immune, gastrointestinal, nervous and cardiovascular systems hence impacting the health of consumers. In this review the mechanisms by which the bioactive peptides derived from milk proteins are generated and the physiological effects the produced where addressed.

Key words: Hydrolysis, bioactive peptides, dairy proteins, health.

INTRODUCCIÓN

La leche y sus derivados son considerados una fuente importante de nutrientes ya que además de suministrar energía, contienen proteínas de alta calidad, minerales y vitaminas (Park 2009). La leche de vaca contiene alrededor de 3.5 % de proteínas, de las cuales el 80 % son caseínas (α , β , γ , y κ) y el resto son proteínas del suero (β -lactoglobulina, α -lactalbumina, seroalbúmina y proteínas minoritarias) (Jauhiainen y Korpela 2007, Fox y McSweeney 2008). Las proteínas son macromoléculas mismas que se definen como componentes estructurales celulares esenciales, debido a las numerosas funciones que desempeñan en el organismo (Vioque *et al.* 2000; Fox y McSweeney 2008). La hidrólisis de éstos componentes tiene como consecuencia la generación de péptidos, mismos que además de cumplir con su función nutricional, como cualquier otra proteína, son capaces de ejercer efectos biológicos benéficos específicos, por lo que se les denominan péptidos bioactivos o biopéptidos (Kumar y Bhalla 2005, Costa *et al.* 2007, Dziuba *et al.* 2009). A la fecha se han aislado diversos biopéptidos de diferentes alimentos tales como: huevo, pescado, pollo, soya, leche (Miguel *et al.* 2007) y mariscos (Kim y Wijesekara 2010, Nazeer y Srividhya 2011). Sin embargo, las proteínas de la leche son consideradas una de las principales fuentes de péptidos bioactivos (Minervini *et al.* 2009, Sanlidere y Oner 2011, Plainsancié *et al.* 2012) que presentan efectos positivos sobre la salud del consumidor (Foltz *et al.* 2007, Miguel *et al.* 2007, Hajirostamloo 2010). Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue analizar la formación, funcionamiento y los beneficios a la salud que presentan los péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche. El método empleado para conducir la recopilación de artículos necesarios para alcanzar el objetivo planteado, se realizó a través del motor de búsqueda de Science Direct, con las palabras de búsqueda: bioactive peptides, and milk bioactive peptides, descargándose los archivos correspondientes en formato pdf. Por lo que en una búsqueda realizada del año 2012 a 2013 se encontraron 286 artículos, mismos de los cuales

se descargaron 127, considerándose importantes o relacionados con el presente 83 artículos publicados entre 1996 y 2013.

Formación de biopéptidos

Como se mencionó anteriormente los biopéptidos, son fragmentos de proteínas que no presentan actividad biológica cuando se encuentran formando parte de una proteína, sin embargo, cuando esta se hidroliza, los péptidos se separan y comienzan a ejercer su función bioactiva (Foltz *et al.* 2007, Weimann *et al.* 2009, Kim y Wijesekara 2010). La bioactividad de los péptidos depende de la secuencia y número de aminoácidos que lo integran, éstos pueden contener entre 2 y 20 aminoácidos (Korhonen y Philanto 2006), mismos que se generan por hidrólisis enzimática, la cual puede llevarse a cabo de tres formas: a) con enzimas digestivas, b) por microorganismos proteolíticos y c) con enzimas proteolíticas derivadas de microorganismos o plantas (Madureira *et al.* 2010, Pritchard *et al.* 2010). Por su importancia tecnológica con frecuencia sobresalen dos métodos de hidrólisis; mediante el uso de enzimas digestivas y por medio de fermentación microbiana, en el entendido de que las enzimas proteolíticas aisladas para hidrolizar las proteínas son producidas por microorganismos principalmente como bacterias u hongos y plantas (Kumar y Bhalla 2005, Korhonen 2009, Ruíz-Giménez *et al.* 2012). Adicionalmente a estas rutas, también se liberan biopéptidos por la acción de enzimas endógenas presentes en la leche, tales como la plasmina y la catepsina (Bouhallab y Bouglé 2004, Ong y Shah 2008).

Los biopéptidos se pueden producir por diferentes mecanismos que son:

Hidrólisis por enzimas digestivas. Las principales enzimas gastrointestinales que producen biopéptidos son: pepsina, tripsina, quimiotripsina, enzima convertidora de angiotensina (ECA), pancreatina y las combinaciones de éstas con otras enzimas bacterianas (Korhonen 2009, Wang *et al.* 2010, Choi *et al.* 2011).

Fermentación microbiana. La fermentación de la leche se da principalmente por la acción de microorganismos que forman parte de los cultivos involucrados en la manufactura de los productos lácteos, particularmente las bacterias ácido lácticas (BAL) (Korhonen 2009, González-González et al. 2011). De estos microorganismos, los más estudiados son *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. (Ebringer et al. 2008), ya que sintetizan enzimas proteolíticas intracelulares como proteasas y peptidasas capaces de liberar biopéptidos (Donkor et al. 2007, Ebringer et al. 2008, González-González et al. 2011). Por otra parte, para inducir la síntesis *in vitro* de algunos biopéptidos, son usados hongos peptidolíticos, como *Aspergillus oryzae* (Engberink et al. 2008, Van der Zander et al., 2008) y *Saccharomyces cerevisiae* (Ong y Shah 2008). Inclusive se han usado algas unicelulares para la producción sintética de biopéptidos, como es en el caso de Campos-Quevedo et al. (2013), que emplearon a *Chlamydomonas reinhardtii* y a partir de proteínas lácteas, sintetizaron péptidos con actividad antihipertensiva, opioide, antimicrobiana e hipocolesterolemica.

Biopéptidos presentes en productos lácteos

A la fecha se han aislado una gran variedad de biopéptidos de la leche y productos lácteos tales como: suero (Ijas et al. 2004, Wang et al. 2010), leches fermentadas con BAL (Ferreira y Eca 2007, Park 2008, Minervini et al. 2009, Nielsen et al. 2009), yogurt (Donkor et al. 2007, Papadimitriou et al. 2007, Paul y Somkuti 2009, Sanlidere y Oner 2011) y quesos tales como cheddar (Haileselassie et al. 1999) y manchego (Gómez-Ruiz et al. 2004). Mismos que a medida que aumenta su periodo de maduración, incrementan la cantidad de péptidos producidos (Korhonen y Pihlanto 2006, Ong y Shah 2008).

Funciones biológicas de los biopéptidos

Los biopéptidos pueden impactar positivamente en la salud del consumidor por medio del

sistema inmune, gastrointestinal, nervioso, cardiovascular y al estado nutricional (Dziuba y Darewicz 2007, Jauhianen y Korpela 2007, Hajirostamloo 2010, Ruíz-Giménez et al. 2012).

Efecto de los biopéptidos sobre el sistema gastrointestinal

Las proteínas y péptidos derivados de la leche influyen la regulación de enzimas digestivas y la absorción de nutrientes en el tracto intestinal (Schanbacher et al. 1997, Caroli et al. 2011). Bouhallab y Bouglé (2004), Martínez y Martínez (2006) y Caroli et al. (2011) mencionan que algunos caseinofosfopéptidos, que son péptidos fosforilados obtenidos de las caseínas, pueden enlazar cationes como zinc, calcio o hierro haciéndolos más estables en diferentes condiciones fisicoquímicas, lo que facilita su absorción intestinal. En un estudio en particular, se observó que el concentrado de péptidos de proteína láctea causaba apoptosis (muerte celular programada) de las células cancerosas (HT-29) presentes en el colon (Kreider et al. 2011). Por otra parte, en ratas, se ha demostrado que la administración oral de la fracción 94-123 de la β -caseína puede mantener y restaurar la homeostasis intestinal debido al efecto que tiene en la expresión de los genes MUC2 y MUC4, los cuales codifican para la síntesis de células (HT29-MTX) de la mucina en el intestino delgado (Plaisancié et al. 2013). Un beneficio adicional que presentan los péptidos bioactivos derivados de los fragmentos de las *K*-caseínas y las lactoferrinas, consiste en la estimulación del crecimiento de bacterias probióticas en el tracto gastrointestinal, tales como bifidobacterias (Park 2009). Otro beneficio, es la actividad antimicrobiana que muestran contra organismos patógenos tales como *Staphylococcus* spp., *Sarcina* spp., *Bacillus* spp., *Diplococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Candida albicans*, *Escherichia coli*, y algunos otros Gram positivos, Gram negativos y dermatofitos (Clare y Swaisgood 2000, Benkerroum 2010, Hernández-Ledesma et al. 2011). Se ha demostrado que la lactoferricina (LFCina) que es un péptido correspondiente al extremo amino-terminal de la lactoferrina, tiene una

actividad bactericida más potente que la de la propia lactoferrina (Martínez y Martínez 2006). La Lfca inhibe numerosos patógenos, de los cuales: virus (Dziuba y Darewicz 2007), como los virus del herpes simplex tipo 1 y 2 (Chatterton *et al.* 2006); bacterias tales como *Bacillus spp.*, *E.coli* 0111 (Clare y Swaisgood 2000), *Helicobacter pylori*, y *Listeria monocytogenes* (Park 2009); y hongos como *Candida albicans* (Clare y Swaisgood 2000). Por otra parte, la isracidina, que es un péptido de 23 residuos de la fracción N - terminal de las α s1- caseínas tiene actividad antimicrobiana contra patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *L. monocytogenes* (Benkerroum 2010).

Efectos de los biopéptidos en el sistema cardiovascular

Diversos estudios han reportado biopéptidos con actividad antioxidante, antihipertensiva, antitrombótica y reguladora de los niveles de colesterol (Ong y Shah 2008) (Tabla 1). En relación a la actividad antihipertensiva, la ECA (Peptidil dipéptido hidrolasa - EC 3.4.15.1), es un dipéptido liberador de una exopeptidasa asociada a la regulación de la presión arterial, ya que participa en la conversión de angiotensina-I en angiotensina - II (Seppo *et al.* 2003, Foltz *et al.* 2007, Ahn *et al.* 2009) algunos biopéptidos pueden inhibir la acción de esta enzima, logrando un efecto antihipertensivo que a su vez beneficia el sistema inmune y nervioso del consumidor ya que favorece el estado de homeostasis (Miguel *et al.* 2007, Minervini *et al.* 2009, Otte *et al.* 2011). Así mismo, los hidrolizados de origen lácteo producidos con tripsina han demostrado una relevante actividad inhibitoria de la ECA (Pripp, 2005) principalmente los péptidos cuyo tamaño es menor de 3 kDa (Alvarado y Guerra 2010, Ruíz-Giménez *et al.* 2012). Por otra parte, las características de los péptidos antihipertensivos son el hecho de que presentan residuos hidrófobos como Trp, Tyr o Phe en una de las tres últimas posiciones de su secuencia; en donde tal estructura peptídica al unirse a los sitios activos de la ECA bloquean la actividad de ésta (Shahidi y Zhong 2008). Dicho bloqueo incrementa también al aumentar la cantidad de

cargas positivas, a partir de la presencia de residuos de Lys o Arg en posiciones terminales del péptido (Shahidi y Zhong 2008, Alvarado y Guerra 2010). Por otra parte, residuos de Pro solos o en combinación con residuos hidrófobos, tienen actividad inhibitoria de la ECA (Alvarado y Guerra 2010). Tal es el caso de los tripéptidos Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro, los cuales se ha demostrado que presentan actividad inhibitoria de la ECA (Aihara *et al.* 2005, Hozer y Kirmaci 2009, Jauhiainen *et al.* 2010, Udenigwe y Aluko 2012) ya que disminuyen significativamente la presión arterial de personas hipertensas (Van Mierlo *et al.* 2009). Así mismo, al aislar dichos péptidos de leches agrias y administrarlos a ratas hipertensas, se inhibió la actividad de la ECA (Sipola *et al.* 2001). Por otro lado Jakala, *et al.* (2009), al monitorear en ratas el tránsito del péptido radiomarcado Ile-Pro-Pro, por el sistema digestivo hasta su adsorción, concluyeron que el enlace Pro-Pro es resistente a las enzimas proteolíticas presentes en el aparato digestivo y por lo tanto, este tripéptido puede llegar a sangre y a otros órganos para desempeñar la actividad ECA inhibitoria, ellos probaron los péptidos Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro en ratas hipertensas, observando una función protectora del endotelio de las arterias, mientras que Jauhiainen *et al.* (2007) mencionan que presentan actividad antihipertensiva. El mismo efecto se ha encontrado al suministrar este biopéptido en personas hipertensas (Jauhiainen *et al.* 2010). Otros péptidos que han presentado actividad de la ECA son: el dipéptido Tyr-Pro, aislado de las proteínas del suero (Korhonen Philanto 2006) y péptidos provenientes de las β -lactoglobulinas como: Leu-Ala-Met-Ala y Val-Phe-Lys (Kamau *et al.* 2010b). Los fragmentos Trp-Leu-Ala-His-Lys (Kamau *et al.* 2010a, FitzGerald *et al.* 2011) y Tyr-Gly-Leu de las α -lactoalbúminas también han mostrado actividad inhibitoria de la ECA (Kamau *et al.* 2010a). Por otra parte, Ruíz-Giménez *et al.* (2012) aislaron 11 péptidos provenientes de la lactoferrina, los cuales ejercieron actividad inhibitoria a la ECA. Así mismo, se ha comprobado que el consumo de proteína hidrolizada de suero ejerce una reducción significativa de la presión sanguínea en personas hipertensas (FitzGerald *et al.* 2004, Martínez y Martínez 2006). Algunos otros péptidos que *in*

Tabla 1. Péptidos bioactivos aislados de proteínas lácteas que ejercen actividad sobre el sistema cardiovascular.

Table 1. Bioactive peptides isolated from milk proteins exert activity on the cardiovascular system.

Péptido	Origen	Referencia
Actividad inhibitoria de la enzima ECA.		
Ile-Pro-Pro	Leches fermentadas	Jakala et al. 2009, Jauhiainen et al. 2007
Val-Pro-Pro	Leches fermentadas	Jakala et al. 2009
Tyr-Pro	Proteínas del suero	Korhonen y Philanto 2006
Ala-Gly-Thr-Trp-Tyr	β - Lactoglobulinas	FitzGerald et al. 2004, Madureira et al. 2010
Tyr-Leu-Leu-Phe	β - Lactoglobulinas	Hernández-Ledesma et al. 2011
Leu-Val-Arg-Thr	β - Lactoglobulinas	Hernández-Ledesma et al. 2011
Leu-Ala-Met-Ala	β - Lactoglobulinas	Kamau et al. 2010b
Val-Phe-Lys	β - Lactoglobulinas	Kamau et al. 2010b
Tyr-Gly-Leu	α - Lactoalbúminas	Kamau et al. 2010b
Trp-Leu-Ala-H is-Lys	α - Lactoalbúminas	FitzGerald et al. 2004, Hernández-Ledesma et al. 2011, Kamau et al. 2010b
Actividad antitrombótica		
Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Asn-Glu-Asp-Lys	κ - caseína	Vioque, et al. 2000
Lys-Asn-Glu-Asp-Lys	κ - caseína	Vioque et al. 2000
Lys-Arg-Asp-Ser-Glu-Arg-Lys-Arg-Asp-Ser	Lactoferrina	Martínez y Martínez 2006
Actividad antioxidante		
Ala-Gly-Thr-Trp-Tyr	β - Lactoglobulinas	Kamau et al. 2010b
Ile-Pro-Ala-Val-Phe-Lys	β - Lactoglobulinas	Kamau et al. 2010b
Met-His-Ile-Arg-Leu	β - Lactoglobulinas	Kamau et al. 2010b

in vitro han mostrado acción inhibitoria de la actividad de la ECA incluyen Leu-Pro-Pro, Ala-Trp, Ile-Trp, Leu-Trp, Val-Tyr, Ile-Tyr y Phe-Tyr, los cuales fueron aislados de yogurt (Foltz et al. 2007). Tsai et al. (2008) inocularon leche con *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, y al separar el suero de la misma, observaron que la capacidad inhibitoria de la ECA se concentraba en el suero, misma que se atribuyó a la secuencia Tyr-Pro-Tyr-Tyr, posteriormente, al administrar el suero a ratas hipertensas observaron disminuciones significativas en la presión sistólica y diastólica. Nielsen et al. (2009) analizaron leches fermentadas con cepas específicas de *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* observando que estas leches presentaban un efecto inhibitorio sobre la ECA. Por otro lado, se encontró que leche fermentada con cepas nativas de *Lactococcus lactis* aisladas de diversos

ecosistemas podían biogenerar fracciones peptídicas con actividad antihipertensiva (Rodríguez-Figueroa et al. 2010), mientras que Sánchez et al. (2011), al administrar caseína bovina hidrolizada a ratas hipertensas durante seis semanas, observaron una reducción de la presión arterial sistólica y diastólica. En un estudio realizado *in vivo* se demostró que algunos biopéptidos son producidos en arterias y venas, tal es el caso de; α -salusin, β -salusin y apelina 36, las cuales funcionan como vasodilatadores contribuyendo a la homeostasis cardiopulmonar (Aydin et al. 2012). Por otra parte, se ha sugerido que existen biopéptidos de origen lácteo que influyen sobre la regulación del colesterol sérico (Turpeinen et al. 2009), tal es el caso de la lactostatina (derivada de la β -lactoglobulina), que administrada oralmente disminuyó significativamente los niveles de colesterol sérico total en animales modelos (Ricci-Cabello et al. 2012). Sin embargo, no se conoce con

certeza cómo actúan estos péptidos, se cree que el efecto que ejercen los péptidos hipocolesterolémicos se debe a que disminuyen la solubilidad micelar del colesterol, es decir, reducen su absorción intestinal, así como la inducción de la transcripción genética de la enzima colesterol-7-hidroxilasa (responsable de metabolizar el colesterol) (Ricci-Cabello *et al.* 2012). Sin embargo, se requiere mayor cantidad de estudios en personas hipercolesterolémicas para evaluar los efectos totales así como los mecanismos de acción de dichos péptidos (Udenigwe y Aluko 2012).

La actividad antitrombótica está también relacionada con la regulación del sistema cardiovascular, de hecho, se ha reportado que tanto las proteínas del suero como algunas caseínas liberan biopéptidos que inhiben enlaces del fibrinógeno y trombina (inhibiendo la formación de trombos) así como también inhiben el factor dependiente de inhibición plaquetaria (Claire y Swaisgood 2000; Jauniaiainen y Korpela 2007). Los principales péptidos antitrombóticos son llamados casoplatelinas, y algunos de ellos son las fracciones de la *K*-caseína de 112-116, 113-116, 106-112 y 106-116 (Vioque *et al.*, 2000); así como fragmentos de otras proteínas lácteas, tal es el caso del péptido Lys-Arg-Asp-Ser-Glu-Arg-Lys-Arg-Asp-Ser, proveniente de la lactoferrina (Martínez y Martínez 2006). Otra aportación de los biopéptidos en el sistema cardiovascular, es la acción antioxidante al eliminar radicales libres y quelar o inhibir especies reactivas de oxígeno (Kamau *et al.* 2010a, Nazeer y Srividhya 2011, Samaranayaka y Li-Chan 2011), retardando así el envejecimiento celular y el progreso de enfermedades crónicas (Chanput, Nakai y Theerakulkait, 2010). Los aminoácidos hidrófobos son cruciales para llevar a cabo la actividad antioxidante, al reconocer las células blanco y enlazarse a ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares (Udenigwe y Aluko 2012), entre estos destacan los péptidos formados de 5 a 11 aminoácidos, que contienen: Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr y Val (Chanput *et al.* 2010, Kamau *et al.* 2010b); así como, Trp o Tyr en la posición del C-terminal del péptido (Shahidi y Zhong 2008). De igual forma, los anillos aromáticos de los aminoácidos como Phe, Tyr y Trp, pueden

contribuir a quelar iones metálicos pro-oxidantes (Samaranayaka y Li-Chan 2011, Udenigwe y Aluko 2012); por ejemplo, las secuencias: Tyr-His-Tyr, Leu-His-Trp y Leu-His-Gly (Chanput *et al.* 2010); los fragmentos: 15-20, 19-29, 12-46, 25-40, 78-83, 92-100 y 145-149 de las β -lactoglobulinas; las fracciones 1-15, 17-31, 109-114 de las α -lactalbuminas, la secuencia de 17- 41 de las lactoferrinas, (Kamau *et al.* 2010b) y el péptido Ala-Arg-His-Pro-His-Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met, aislado de la κ -caseína presentan actividad antioxidante (Sanlidere y Oner 2011). Abadía-García *et al.* (2013), a partir de extractos de queso cottage elaborado con diferentes probióticos, encontraron que todos ellos ejercían actividad antioxidante, la cual aumentaba durante el periodo de maduración. Finalmente, Contreras *et al.* (2013) sometieron diferentes péptidos aislados de caseínas α s1 (Arg-Tyr-Lys-Gly-Tyr, Ala-Tyr-Phe-Thy-Pro-Glu-Leu y Tyr-Gln-Lys-Phe-Pro-Gln-Tyr) a una hidrólisis parcial con enzimas digestivas, observando que estos conservaban su actividad antioxidante.

Biopéptidos en la regulación del sistema nervioso

En 1975 se aislaron por primera vez péptidos endógenos con actividad opioide, los cuáles provenían de hidrolizados de proteínas lácteas (Vioque *et al.* 2000) y desde entonces se han identificado diversos biopéptidos que son liberados de las proteínas de la leche que presentan esta actividad (Sing y Sachan 2011). Los receptores opioides están localizados en los sistemas endócrino, inmune y nervioso, y son agentes que se unen a receptores del dolor o neurotransmisores. Algunas moléculas opioides pueden actuar relajando músculos lisos, favoreciendo así el transporte de electrolitos (Korhonen y Philanto 2006) o inhibiendo neurotransmisores como los relacionados con el dolor y la hipotensión (Madureira *et al.* 2010). Específicamente algunos péptidos con actividad opioide pueden actuar uniéndose a receptores, como moduladores exógenos de la motilidad intestinal, de la permeabilidad epitelial o por medio de la liberación de hormonas intestinales (Martínez y Martínez 2006). La caracterís-

tica común de los péptidos que presentan actividad opioide, es el hecho de que presentan un residuo de Tyr en el extremo N-terminal conjuntamente con otro residuo aromático ya sea de Phe o Tyr en la tercera o cuarta posición de la secuencia de aminoácidos (Vioque *et al.* 2000, Shahidi y Zhong 2008, Haque *et al.* 2009, Alvarado y Guerra 2010). Los péptidos más reconocidos que tienen esta función son los fragmentos de la β -caseína llamados β -casomorfina, los cuales ofrecen un efecto similar a la morfina y han sido estudiados tanto *in vitro* como *in vivo* (Haileselassie *et al.* 1999, Ebringer *et al.* 2008). Algunas casomorfina son capaces de estimular la absorción intestinal de agua y electrolitos, y de esta manera reducir la motilidad intestinal, funcionando como termorreguladores o suprimiendo la secreción gástrica (Ebringer *et al.* 2008). Otros péptidos estudiados que muestran actividad opioide son: los fragmentos de lactoferrinas α -lactofina y β -lactofina (Clare y Swaisgood 2000, Ijas *et al.* 2004); los fragmentos de lactotransferina llamados lactoferrocina A, B y C (Haileselassie *et al.* 1999, Clare y Swaisgood 2000) y las casoxinas C y D así como la α -caseína exorfina (Martínez y Martínez 2006). Por ejemplo, el péptido 50-53 de la α -lactofina, la fracción Tyr-Gly-Leu-Phe proveniente de la β -lactoglobulina (Kamau *et al.* 2010a), la secuencia Tyr-Leu-Gly-Ser-Gly-Tyr-OCH₃ aislada de la lactoferroxina A (Martínez y Martínez 2006) y los fragmentos Pro-Glu-Gly-Asp y Tyr-Leu-Leu-Phe de las β -lactoglobulinas, son reconocidos por su actividad opioide (Kamau *et al.* 2010b). Así como las β -lactofinas potencian la motilidad intestinal, las β -lactotencinas presentan numerosos efectos opioides tales como analgésicos, relajantes hipocolesterolémicos, y potenciadores de la memoria (Hernández-Ledesma *et al.* 2011).

Biopéptidos en la regulación del sistema inmune

Otra clase de péptidos con actividad biológica son aquellos que pueden funcionar como inmunomoduladores o inmunopotenciadores; es decir, alteran la función biológica de algunas proteínas que poseen la habilidad de modificar el sistema

inmune a través de diversos medios tales como: la proliferación de linfocitos (Clare y Swaisgood 2000, Agyei y Danquah 2012, Feng *et al.* 2012), el incremento en la actividad fagocítica de algunos macrófagos (Vioque *et al.* 2000), el aumento en la síntesis de anticuerpos (Korhonen y Philanto 2006), la estimulación de inmunoglobulinas (Agyei y Danquah 2012) y la regulación de citoquinas (Madureira *et al.* 2010); las citoquinas son una red de intermediarios que operan diferentes funciones inmunes en el organismo (Ebringer *et al.* 2008). Varios estudios sugieren que algunas secuencias de biopéptidos refuerzan el sistema inmune, alivian reacciones alérgicas, potencian la actividad de los linfocitos y mejoran la reacción contra microorganismos como *Klebsiella pneumoniae* (Clare y Swaisgood 2000, Vioque *et al.* 2000, Kamau *et al.* 2010a). Sin embargo, la estructura de los biopéptidos que está relacionada con la actividad inmunomoduladora aún no está definida, se cree que una arginina en la posición N- o C- terminal del péptido es importante para que sea reconocida por los receptores de membrana (Haque *et al.* 2009) y que la presencia de una glutamina tiene influencia sobre el sistema inmune (Chanput *et al.* 2010). Así mismo, los péptidos con actividad inmunomoduladora pueden favorecer el transporte de iones, éste tipo de péptidos son principalmente caseinofosfopéptidos, que tienen la capacidad de formar sales solubles organofosforadas y de transportar minerales como hierro o calcio; así como actuar previniendo caries mediante la calcificación de los dientes (Vioque *et al.* 2000, Singh y Sachan 2011). En este sentido, se ha estudiado en cultivos celulares la proliferación de linfocitos, la cual aumentó significativamente en presencia de los péptidos β -casomorfina7, β -casokina-10, Tyr-Gly y Tyr-Gly-Gly (Kayser y Meisel 1996). Por otra parte, la LFcina (fragmento de la lactoferrina) puede inhibir la acción de citoquinas liberadas, como la Isoleucina-6 y también posee la capacidad de atravesar la membrana nuclear, entrar en la célula y unirse al DNA, o bien actuar como factor de transcripción; además, este fragmento posee actividad antitumoral, siendo capaz de inhibir la metástasis e inducir la apoptosis selectiva de células cancerosas (Martínez y Martínez 2006), adicionalmente

posee propiedades anticancerígenas, inmunomoduladoras y antimicrobianas contra bacterias, hongos y virus; dichas propiedades pueden estar relacionadas con la presencia de residuos de triptófano o arginina en el péptido. Sin embargo, las facultades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de la LFC_{1a} están más relacionadas con la presencia de cargas positivas dentro de la molécula (Haque *et al.* 2009).

Péptidos multifuncionales

Se han reportado péptidos que presentan más de una función bioactiva (Weimann *et al.* 2009, Udenigwe y Aluko 2012), por ejemplo, la fracción Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp de las caseínas α S₁ presenta funciones inmunomoduladoras como la estimulación de la fagocitosis de macrófagos (Kayser y Meisel 1996) y presenta actividad inhibitoria de la enzima ECA (Udenigwe y Aluko 2012). Por otra parte, la fracción 206-208 de las caseínas α S₂, ejerce función antimicrobiana, actividad antioxidante y es un potente antihipertensivo (Pripp 2005). Otro péptido multifuncional es la secuencia Ala-Gly-Thr-Trp-Tyr, correspondiente al fragmento 15-20 de las β -lactoglobulinas, que presenta actividad inhibitoria de la enzima ECA, (FitzGerald *et al.* 2004, Madureira *et al.* 2010) así como actividad antioxidante (Kamau *et al.* 2010b). Otro ejemplo es la β -lactorfina, que ha demostrado actividad opioide y capacidad para inhibir la actividad de la ECA (Udenigwe y Aluko 2012). Finalmente, la β -casomorfina 7 ofrece actividad opioide a nivel intestinal (Plaisancié *et al.* 2013) y participa en la proliferación de linfocitos (Kayser y Meisel 1996).

Biodisponibilidad

La efectividad de los biopéptidos depende de su capacidad para alcanzar intacto el órgano blanco (Madureira *et al.* 2010). Al ingerirse las proteínas, son desnaturalizadas por los ácidos gástricos y la pepsina presentes en el estómago, posteriormente los fragmentos son hidrolizados por proteasas a péptidos, los cuales van a las células de la mucosa para ser hidrolizados por peptidasas, una parte de éstos son aprovechados por enterocitos y otra

fracción pasa al hígado para emplearse en las funciones hepáticas, el resto se incorpora a la circulación general para ser utilizados por otros órganos (Martínez y Martínez 2006). En general, se ha observado que los biopéptidos presentan efectos benéficos, sin embargo, éstos pueden inhibirse o disminuirse antes de llegar a su órgano blanco, debido a las diferentes condiciones a las que se enfrentan en el organismo (Madureira *et al.* 2010). Por ejemplo, los péptidos pequeños como los dipéptidos y tripéptidos han presentado actividad *in vivo*, resistiendo la peptidólisis, logrando así ser absorbidos intactos para posteriormente pasar a la circulación (Sipola *et al.* 2001). Aunado a lo anterior también debe considerarse los tratamientos térmicos a los que son sometidos los productos lácteos durante su procesamiento. Dichos tratamientos pueden ocasionar la desnaturalización e hidrólisis de las proteínas y por lo tanto la formación de péptidos diferentes, mismos que pueden poseer o no bioactividad (Costa *et al.* 2007). Por otra parte, considerando la carga neta, el peso molecular, la lipofilicidad y la solubilidad de los péptidos, éstos pueden ser químicamente modificados para aumentar su estabilidad por medio de diferentes técnicas (Ricci *et al.* 2010; Udenigwe y Aluko 2012), como lo son: la lipidización (aumento de la absorción intestinal), la glicosilación (aumento de la permeabilidad y estabilidad en el suero sanguíneo) ó la microencapsulación (incremento de la farmacocinética y la permeabilidad). Cabe mencionar que éstas técnicas pueden ofrecer desventajas como la disminución de la afinidad al sitio de unión del receptor del péptido o el aumento de la unión a algunas proteínas séricas (Ricci *et al.* 2010).

Técnicas de identificación y cuantificación de biopéptidos

Para la identificación y cuantificación de los biopéptidos, es necesario extraerlos de la matriz alimentaria en donde se encuentran, lo cual se realiza por medio de técnicas de separación, tales como; la centrifugación y la separación con membranas o filtros (Quirós *et al.* 2007, Minervini *et al.* 2009, González-González *et al.* 2011, Otte *et*

al. 2011), posteriormente se identifican los péptidos y cuantifican (Nielsen *et al.* 2009). Dentro de las técnicas utilizadas para su cuantificación, se incluyen la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) (Pritchard *et al.* 2010) y la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP), por medio de la cual se obtienen cromatogramas con distintos picos que representan diferentes péptidos (Miguel *et al.* 2006; Ferreira y Eca 2007, Ong y Shah 2008, Ahn *et al.* 2009). La secuenciación de los biopéptidos se lleva a cabo a partir de las fracciones peptídicas (Ong y Shah 2008, Ahn *et al.* 2009) algunas de las técnicas usadas para éste propósito son la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS) (Quirós *et al.* 2007) o la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), éstas técnicas logran separar las moléculas de los analitos e interpretarlas en cromatogramas (Miguel *et al.* 2007, Nielsen *et al.* 2009) y es ampliamente recomendada para la identificación de di, tri y tetra péptidos inclusive ramificados y no ramificados (Larichi *et al.* 2013).

CONCLUSIÓN

A la fecha existe suficiente evidencia científica que sustenta que algunos péptidos liberados de las proteínas de origen láctico, presentan bioactividad. Dichos péptidos se encuentran inactivos cuando están encriptados en las proteínas, pero al hidrolizarse por las enzimas digestivas o microbianas, pueden ejercer su función actuando sobre los sistemas gastrointestinal, nervioso, cardiovascular e inmune influyendo positivamente en la salud del consumidor. Sin embargo, es necesario investigar con profundidad, ya que se ha explorado poco la biodisponibilidad de los péptidos bioactivos después de someter los productos lácteos a procesos térmicos o durante la vida en anaquel. Así mismo, es importante recalcar que la efectividad de los péptidos bioactivos está condicionada a alcanzar al órgano blanco sin ser hidrolizado, por lo que es de vital relevancia la utilización de modelos *in vitro* que permitan simular las condiciones gastrointestinales así como estudios *in vivo* que favorezcan la comprensión de los mecanismos involucrados en éste proceso.

LITERATURA CITADA

- Abadía-García L, Cardador A, Martín del Campo ST, Arvízu SM, Castaño-Tostado E, Regalado-González C, García-Almendarez B, Amaya-Llano SL (2013) Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. *International Dairy Journal* 33: 191-197.
- Agyei D, Danquah MK (2012) Rethinking food-derived bioactive peptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. *Food Science Technology Research* 23: 62-69.
- Ahn JE, Park SY, Atwa A, Gibbs BF, Lee BH (2009) Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey fermented by *Lactobacillus* species. *Journal of Food Biochemistry* 33: 589-602.
- Aihara K, Kajimoto O, Hirata H, Takahashi R, Nakamura Y (2005) Effect of Powdered Fermented Milk with *Lactobacillus helveticus* on Subjects with High-Normal Blood Pressure or Mild Hypertension. *Journal of the American College of Nutrition* 24(4): 257-265.
- Alvarado CC, Guerra M (2010) Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *Anales Venezolanos de Nutrición* 23(1): 42-49.
- Aydin S, Eren MN, Aydin S, Ozercan IH, Dagli AF (2012) The bioactive peptides salusins and apelin-36 are produced in human arterial and venous tissues and the changes of their levels during cardiopulmonary bypass. *Peptides* 37(2): 233-239.
- Benkerroum N (2010) Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. *International Journal of Dairy Technology* 63(2): 320-338.

- Bouhallab S, Bouglé D (2004) Biopeptides of milk: caseinophosphopeptides and mineral bioavailability. *Reproduction Nutrition Development* 44: 493-498.
- Campos-Quevedo N, Rosales-Mendoza S, Paz-Maldonado LMT, Martínez-Salgado JC, Guevara-Arauz , Soria-Guerra RE (2013) Production of milk-derived bioactive peptides as precursor chimeric proteins in chloroplasts of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 113: 217-225.
- Caroli A, Poli A, Ricotta D, Banfi G Cocchi D (2011) Dairy intake and bone health: a viewpoint from the state of the art. *Journal of Dairy Science* 94: 5249-5262.
- Chanput W, Nakai S, Theerakulkait C (2010) Introduction of new computer softwares for classification and prediction purposes of bioactive peptides: case study in antioxidative tripeptides. *International Journal of Food Properties* 13: 947-959.
- Chatterton D, Smithers G, Roupas P, Brodkorb A (2006) Bioactivity of b-lactoglobulin and a-lactalbumin- Technological implications for processing. *International Dairy Journal* 16: 1229-1240
- Choi J, Sabikhi L, Hassan A, Sanjeev A (2012) Bioactive peptides in dairy products. *International Journal of Dairy Technology* 65(1): 1-12.
- Clare DA, Swaisgood HE (2000) Bioactive Milk Peptides: A Prospectus. *Journal of Dairy Science* 83: 1187-1195.
- Costa EL, Rocha JA., Maria F (2007) Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. *International Dairy Journal* 17: 632-640.
- Contreras MM, Sanchez D, Sevilla MA, Recio I, Amigo L (2013) Resistance of casein-derived bioactive peptides to simulated gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal* 32: 71-78
- Donkor ON, Nilmini SLI, Stolic P, Vasiljevic T, Shah NP (2007) Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal* 17: 657-665
- Dziuba M, Darewicz M (2007) Food Proteins as Precursors of Bioactive Peptides-Classification Into Families. *Food Science and Technology International* 13: 393-404.
- Dziuba M, Dziuba B, Iwaniak A (2009) Milk proteins as precursors of bioactive peptides. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 8(1): 71-90.
- Ebringer I, Ferencik M, Krajcovi J (2008) Beneficial health effects of milk and fermented dairy products review. *Folia microbiology* 53(5): 378-394.
- Engberink MF, Schouten, EG, Kok FJ, Van Mierlo LAJ, Brouwer IA, Geleijnse JM (2008) Lactotripeptides show no effect on human blood pressure results from a double-blind randomized controlled trial. *Hypertension* 51: 399-405.
- Feng XL, Liu, QT, Cao RB, Zhou B, Zhang YP, Liu K, Liu XD, Wei JC, Li XF, Chen PY (2012) Characterization and immunomodulatory function comparison of various bursal-derived peptides isolated from the humoral central immune organ. *Peptides* 33: 258-264.
- Ferreira I, Eca R (2007) Development and Validation of an HPLC/UV Method for Quantification of Bioactive Peptides in Fermented Milks. *Journal of Liquid Chromatography Related Technologies* 30: 2139-2147.
- FitzGerald RJ, Murray BA, Walsh DJ (2004) The Emerging Role of Dairy Proteins and Bioactive: Peptides in Nutrition and Health. *Journal of Nutrition* 134: 980s-988s.
- FitzGerald RJ, Murray BA, Walsh DJ (2004) The Emerging Role of Dairy Proteins and Bioactive: 394 Peptides in Nutrition and Health. *Journal of Nutrition* 134: 980S-988S.

- Foltz M, Meynen EE, Bianco V, Van Platerink C, Koning TMMG, Kloek J (2007) Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides from a Lactotripeptide-Enriched Milk Beverage are absorbed intact into the Circulation. *Journal of Nutrition* 137: 953-958.
- Fox PF, Mc Sweeney PLH (2008) *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Cork, Irlanda: Thompson Science. 479 pp.
- Gómez-Ruiz JA, Ramos M, Recio I (2004) Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal* 14:1075-1080.
- González-González CR, Tuohy KM, Jauregi P (2011) Production of angiotensin - I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with pH and peptides on the ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal* 21: 615-622.
- Haileselassie SS, Lee BH, Gibbs BF (1999) Purification and Identification of Potentially Bioactive Peptides from Enzyme-Modified Cheese. *Journal of Dairy Science* 82(8): 1612-1617.
- Hajirostamloo B (2010) Bioactive Component in Milk and Dairy Product. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 72: 162-166.
- Haque E, Chand R, Kapila S (2009) Biofunctional Properties of Bioactive peptides of Milk Origin. *Food Reviews International* 25: 28-43.
- Hernández-Ledesma B, Ramos M, Gómez-Ruiz JA (2011) Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. *Small Ruminant Research* 101: 196-204.
- Hernández-Ledesma B, Recio I, Ramos M (2002) Preparation of ovine and caprine b-lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine b-lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *International Dairy Journal* 12: 805-812.
- Ijas H, Collin M, Finckenberg P, Pihlanto-Leppala A, Korhonen H, Korpela R, Vapaatalo H, Nurminen MA (2004) Antihypertensive opioid-like milk peptide a-lactorphin: lack of effect on behavioural tests in mice. *International Dairy Journal* 14: 201-205.
- Ozer B, Kirmaci HA (2009) Functional milks and dairy beverages. *International Journal of Dairy Technology* 63: 1-15.
- Jakala P, Jauhiainen T, Korpela R, Vapaatalo H (2009) Milk protein-derived bioactive tripeptides Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro protect endothelial function in vitro in hypertensive rats. *Journal of Functional Foods* 1: 266-273.
- Jauhiainen T, Korpela R (2007) Milk Peptides and Blood Pressure. *Journal of Nutrition* 137: 825S-829S.
- Jauhiainen T, Ronnback M, Vapaatalo H, Wuolle K, Kautiainen H, Groop PH, Korpela R (2010) Long-term intervention with *Lactobacillus helveticus* fermented milk reduces augmentation index in hypertensive subjects. *European Journal of Clinical Nutrition* 64: 424-431
- Jauhiainen T, Wuolle K, Vapaatalo H, Kerojoki O, Nurmela K, Lowrie C, Korpela R (2007) Oral absorption, tissue distribution and excretion of a radiolabelled analog of a milk-derived antihypertensive peptide, Ile-Pro-Pro, in rats. *International Dairy Journal* 17: 1216-1223.
- Kamau SM, Cheison SC, Chen W, Liu XM, Rong L (2010a). Alpha-Lactalbumin: Its Production Technologies and Bioactive Peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9: 197-212.
- Kamau SM, Rong L, Chen W, Liu XM, Tian FW, Shen Y, Gao, T (2010b). Functional significance of bioactive peptides derived from milk proteins. *Food Review International* 26: 386-401.

- Kayser H, Meisel H (1996) Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Letters* 383: 18-20.
- Kim S, Wijesekara I (2010) Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides. *Journal of Functional Foods* 2: 1-9.
- Korhonen H (2009) Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods* 1: 177-187.
- Korhonen H, Pihlanto A (2006) Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal* 16: 945-960.
- Kreider RB, Losia M, Cooke M, Hudson G, Rasmussen C, Chen H, Mollstedt O, Tsai MH (2011) Bioactive properties and clinical safety of a novel milk protein peptide. *Nutrition Journal* 10(99): 1-8.
- Kumar D, Bhalla TC (2005) Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68: 726-736.
- Madureira AR, Tavares T, Gomes AMP, Pintado ME, Malcata FX (2010) Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science* 93: 437-455. Martínez AO, Martínez VME (2006) Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria* 21(2): 1-14.
- Miguel M, Manso M, Alexandre A, Alonso MJ, Salaices M, López-Fandiño R (2007) Vascular effects, Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity, and Antihypertensive Properties of Peptides Derived from Egg White. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55: 10615-10621.
- Miguel M, Recio I, Ramos M, Delgado MA, Alexandre MA (2006) Antihypertensive effect of peptides obtained from *Enterococcus faecalis*-Fermented Milk in Rats. *Journal of Dairy Science* 89: 3352-3359.
- Minervini F, Bilancia MA, Siragusa S, Gobetti M, Caponio F (2009) Fermented goats milk produced with selected multiple starters as a potentially functional food. *Food Microbiology* 26: 559-564.
- Nazeer RA, Srividhya TS (2011) Antioxidant Peptides from the Protein Hydrolysates of *Conus betulinus*. *International Journal of Peptides Research and Therapeutics* 17:231-237.
- Nielsen MS, Martinussen T, Flambard B, Sorensen KI, Otte, J (2009) Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *International Dairy Journal* 19: 155-165.
- Ong L, Shah NP (2008) Release and identification of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. *Food Science Technology-LEB* 41: 1555-1566.
- Otte J, Lenhard T, Flambard B, Sorensen KI (2011) Influence of fermentation temperature and autolysis on ACE-inhibitory activity and peptide profiles of milk fermented by selected strains of *Lactobacillus helveticus* and *Lactococcus lactis*. *International Dairy Journal* 21: 229-238
- Park YW (2009). *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. Athenas Georgia, USA: Wiley-Blackwell. 396 pp.
- Paul M, Somkuti GA (2009) Degradation of milk-based bioactive peptides by yogurt fermentation bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 49: 345-350.
- Plaisancié P, Claustre J, Estienne M, Henry G, Boutrou R, Paquet A, Léoni I (2013) A novel bioactive peptide from yoghurts modulates expression of the gel-forming MUC2 mucin as well as population of goblet cells and paneth cells along the small intestine. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 24(1): 213-221.

- Prupp H (2005) Initial proteolysis of milk proteins and its effect on formation of ACE-inhibitory peptides during gastrointestinal proteolysis: a bioinformatic, in silico, approach. *European Food Research and Technology* 221: 712-716.
- Quirós A, Ramos M, Muguerza B, Delgado MA, Miguel M, Aleixandre A, Recio I (2007) Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal* 17: 33-41.
- Pritchard SR, Phillips M, Kailasapathy K (2010) Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Reserch International* 43: 1545-1548.
- Ricci-Cabello I, Artacho R, Olalla M (2010) Milk Protein Peptides With Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory (ACEI) Activity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50: 390-402.
- Ricci-Cabello I, Artacho R, Olalla M (2012) Possible role of milk-derived bioactive peptides in the treatment and prevention of metabolic syndrome. *Nutrition Reviews* 70 (4): 241-255.
- Rodríguez-Figueroa JC, Reyes-Díaz R, González-Córdova AF, Troncoso-Rojas R, Vargas-Arispuro I, Vallejo-Córdoba B (2010) Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk fermented by wild and industrial *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Dairy Science* 93: 5032-5038.
- Ruiz-Giménez P, Salom JB, Marcos JF, Vallés S, Martínez-Maqueda DF, Recio I, Torregrosa G, Alborch E, Manzanares P (2012) Antihypertensive effect of a bovine lactoferrin pepsin hydrolysate: Identification of novel active peptides. *Food Chemistry* 131: 266-273.
- Samaranayaka A, Li-Chan E (2011) Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods* 3: 229-254.
- Sánchez D, Kassan M, Contreras MM, Carrón R, Recio I, Montero MJ, Sevilla MA (2011) Long-term intake of a milk casein hydrolysate attenuates the development of hypertension and involves cardiovascular benefits. *Pharmacological Reserch* 63(5): 398-404.
- Sanlidere HA, Öner Z (2011) Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. *Journal of Dairy Science* 94: 5305-5314.
- Schanbacher FL, Talhouk RS, Murray FA (1997) Biology and origin of bioactive peptides in milk. *Livestock Production Science* 50: 105-123.
- Seppo L, Jauhiainen T, Pouss T, Korpela R (2003) A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressurelowering effect in hypertensive subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 77: 326-330.
- Shahidi F, Zhong Y (2008) Bioactive peptides. *Journal of AOAC International* 91(4): 914-931.
- Singh VP, Sachan N (2011) Nutraceutical properties of Milk and Milk products. *American Journal of Food Technology* 1: 1-6.
- Sipola M, Finckenberg P, Santisteban J, Korpela R, Vapaatalo H, Nurminen ML (2001) Long-term intake of milk peptides attenuates development of hypertension I spontaneously Hypertensive rats. *Journal of Physiology Pharmacology* 52(4): 745-754.
- Tamime A. (2005) *Probiotic Dairy Products*. Ayr UK: Blakwell publishing. 216 pp.
- Tsai JS, Chen TJ, Pan BS, Gong SD, Chung MY (2008) Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease facilitated lactic acid fermentation of milk. *Food Chemistry* 106: 552-558.
- Turpeinen AM, Kumpu M, Ronnback M, Seppo L, Kautiainen H, Jauhiainen T, Vapaatalo H, Korpela R (2009) Antihypertensive and cholesterol-lowering effects of a spread containing bioactive peptides IPP and VPP and plant sterols. *Journal of Functional Foods* 1: 260-265.

- Udenigwe CU, Aluko RE (2012) Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production Processing and Potential Health Benefits. *Journal of Food Science* 71: R11-R24.
- Van der Zander K, Bots ML, Bak AAA, Koning MMG, Leeuw PW (2008) Enzymatically hydrolyzed lactotriptides do not lower blood pressure in mildly hypertensive subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 88: 1697-1702.
- Van Mierlo LAJ, Koning MMG, Van der Zander K, Draijer R (2009) Lactotriptides do not lower ambulatory blood pressure in untreated whites: results from 2 controlled multicenter crossover studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 89: 617-623.
- Vioque JR, Sánchez-Vioque A, Clemente A, Pedroche J, Yust MM, Millán F (2000) Péptidos bioactivos en proteínas de reserva. *Grasas y Aceites* 51(5): 361-365.
- Wang L, Mao X, Cheng X, Xiong X, Ren F (2010) Effect of enzyme type and hydrolysis conditions on the in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and ash content of hydrolysed whey protein isolate. *International Journal of Food Science and Technology*, 45: 807-812.