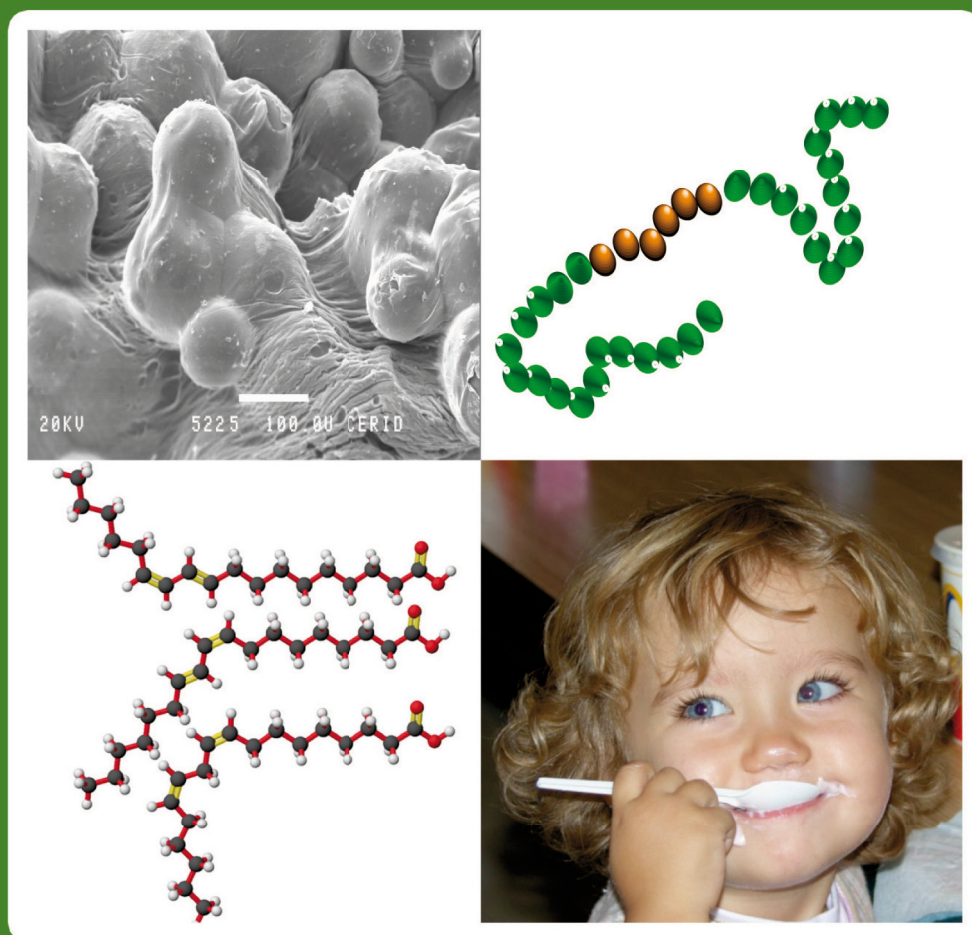


Funcionalidad de Componentes Lácteos



Eds: Javier Fontecha, Isidra Recio, Ana M.R. Pilosof



Funcionalidad de Componentes Lácteos

Javier Fontecha, Isidra Recio, Ana M.R. Pilosof

2009



PRÓLOGO

El presente libro ha sido concebido como el corolario de las actividades del Proyecto de Cooperación Iberoamericana CYTED 105PI0274 que lleva por título "Valorización de subproductos lácteos de interés industrial y para el diseño de alimentos para grupos vulnerables", desarrollado entre 2005 y 2008. El Programa CYTED (Ciencia y Tecnología para el Desarrollo) es el programa de referencia de cooperación en ciencia y tecnología para el desarrollo en Iberoamérica y su objetivo es alcanzar resultados transferibles a los sistemas productivos y a la mejora de la calidad de la vida de la Región Iberoamericana.

El objetivo de este libro es presentar los avances más recientes sobre las propiedades funcionales de componentes lácteos desde el punto de vista físico-químico y de actividad biológica.

Iberoamérica exhibe una larga tradición en la producción y el consumo de productos lácteos. Por lo tanto, la investigación y desarrollo para la valorización de componentes lácteos es la base para la innovación de este dinámico sector. En el presente libro se presentan nuevas estrategias para el aprovechamiento integral del suero de quesería, de componentes proteicos, lactosa y ácidos grasos de la leche, revalorizando su funcionalidad, ya sea como ingredientes de aplicación tecnológica, o por sus propiedades bioactivas. También se presentan avances en la utilización de componentes de la soja y fibra en productos lácteos y en el área de alergenidad de proteínas lácteas.

Las estrategias abordadas permiten por una parte, la valorización de los subproductos de las industrias lácteas y, por otra, el establecimiento de las bases para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales con actividades biológicas y alimentos para grupos con requerimientos nutricionales especiales.

Los autores que contribuyen en este libro han participado muy comprometidamente en el desarrollo del proyecto CYTED 105PI0274, permitiendo la generación de una vasta red de colaboraciones científicas, el mejoramiento de las capacidades de investigación de los grupos e instituciones participantes y la formación de recursos humanos altamente calificados. A todos ellos nuestro agradecimiento por haber aportado su valiosísima experiencia en los distintos capítulos de este libro.

También manifestamos nuestro agradecimiento al Programa CYTED, por el apoyo brindado en todos estos años a nuestras actividades.

Ana M. R. Pilosof

Coordinador del proyecto CYTED 105PI0274

Javier Fontecha

Isidra Recio

ÍNDICE

Capítulo 1

Hidrólisis enzimática de lactosa en leche y permeados de lactosuero con β -galactosidasa (*Bacillus circulans*) inmovilizada en resinas acrílicas atrapadas en una matriz de alginato.

R. Torres, E. J. Mammarella, S. A. Regenhardt, F. D. Batista-Viera y A. C. Rubiolo. 1-24

Capítulo 2

Ingeniería enzimática de β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* para su aplicación en procesos de transglucosilación de lactosa.

C. Giacomini, G. Irazoqui, B. M. Brena y F. Batista-Viera. 25-48

Capítulo 3

Estudio reológico de sistemas elaborados con proteínas de suero tratadas térmicamente y congeladas.

B. E. Meza¹, R. A. Verdini y A. C. Rubiolo. 49-70

Capítulo 4

Implicaciones de las propiedades interfaciales en las características espumantes de proteínas lácteas.

J. M. Rodríguez Patino, M^a. R. Rodríguez Niño y C. Carrera Sánchez. 71-92

Capítulo 5

Estrategias para mejorar la funcionalidad de concentrados de proteínas lácteas comerciales.

L. G. Santiago y A. A. Perez. 93-116

Capítulo 6

Conservación de suero de queso por aplicación de antimicrobianos naturales.

M. von Staszewski, L. Hernaez, S. Mugliaroli, y R.J. Jagus. 117-140

Capítulo 7

Enriquecimiento de productos lácteos con fibra: influencia sobre la microbiota iniciadora.

E. Sendra, E. Sayas-Barberá, J. Fernández-López, C. Navarro y J.A. Pérez-Alvarez. 141-158

Capítulo 8.

Carbohidratos prebióticos derivados de la lactosa.

N. Corzo, A. Montilla, A. Cardelle-Cobas, A. Olano. 159-178

Capítulo 9

Obtención de seroproteínas funcionales vía reacción de Maillard.

M. Villamiel, R. López-Fandiño, A. C. Soria, M. Corzo-Martínez y F. J. Moreno. 179-196

Capítulo 10

Alergia a proteínas lácteas.

E. Molina, .R. Chicón, J. Belloque, R. López-Fandiño. 197-222

ÍNDICE

Capítulo 11

Estructura y funcionalidad del glicomacropéptido bovino.

F. J. Moreno y R. López-Fandiño. 223-249

Capítulo 12

Componentes bioactivos de la grasa láctea.

M. Juárez y J. Fontecha. 250-274

Capítulo 13

Actividad antibacteriana de los péptidos lácteos.

I. López-Expósito, J. Á. Gómez-Ruiz, W. Carrillo, I. Recio. 275-304

Capítulo 14

Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas lácteas.

B. Hernández-Ledesma, M.M. Contreras, I. Recio, M. Ramos. 305-326

Capítulo 15

Recuperación y revalorización del lactosuero para la producción de nuevos productos con propiedades funcionales.

A.R. Madureira, A.I. Pintado, A. M. Gomes, F. X. Malcata y M. E. Pintado 327-352

Capítulo 16

Componentes de la soja como ingredientes funcionales en lácteos.

M. D. del Castillo Bilbao, M. Amigo-Benavent y J. M. Silván Jiménez. 353-376

Capítulo 17.

Valorización de proteínas del lactosuero por interacción con polisacáridos.

A. M. R. Pilosof, O. E. Pérez, K. D. Martínez, M. J. Martínez, N. A. Camino y F. L. Jara. 377-399

Hidrólisis enzimática de lactosa en leche y permeados de lactosuero con β -galactosidasa (*Bacillus circulans*) inmovilizada en resinas acrílicas entrampadas en una matriz de alginato.

Pedro R. Torres¹, Enrique J. Mammarella², Silvina A. Regenhardt², Francisco D. Batista-Viera¹ y Amelia C. Rubiolo²

¹: Cátedra de Bioquímica, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, General Flores (2124), Montevideo, Uruguay.
Tel.: +598 (2) 924 1806. Fax: +598 (2) 924 1906,
E-mail: fbatista@fq.edu.uy.

²: Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (Universidad Nacional del Litoral-Conicet), Güemes 3450 (S3000GLN) Santa Fe, Argentina.
Tel.: +54 (342) 451 1595 ext. 1076. Fax: +54 (342) 451 1079.
E-mail: arubiolo@intec.unl.edu.ar

1. Introducción

El lactosuero es una importante fuente de nutrientes, ya que contiene un poco más del 25% de las proteínas de la leche, cerca del 8% de la materia grasa y del 95% de la lactosa (Smithers y Copeland, 1997). La alternativa de reaprovechamiento que más se ha explorado en los últimos años es la recuperación de los nutrientes de alta calidad que tiene el lactosuero, mediante la aplicación de procesos de membranas, transformándolo en polvo (Byrne y Fitzpatrick, 2002). En el caso de la ultrafiltración las membranas utilizadas retienen las proteínas del suero y son completamente permeables a lactosa y sales minerales, dando como resultado la obtención de concentrados proteicos (Zall, 1992), mientras que la nanofiltración permite además la retención del componente lactosa del suero (Alkhatim y col., 1998). Así puede encontrarse en algunas industrias lácteas, procesos para obtener suero entero deshidratado, suero desmineralizado, concentrados proteicos y lactosa refinada. No obstante, en la actualidad se siguen descartando grandes cantidades de suero. Aproximadamente el 47% de los 115 millones de toneladas anuales de suero

producidas en el mundo se dispone en ríos, lagos y otros cuerpos de agua. Esto representa una significativa pérdida de recursos y causa serios problemas de polución dado que el suero es un contaminante orgánico con altas DBO (40.000-60.000 ppm) y DQO (50.000-80.000 ppm). Más del 90% de esta DBO se debe a la lactosa.

Por consiguiente, es importante desarrollar procesos que permitan utilizarlo integralmente con el fin adicional de no contaminar el medio ambiente y de recuperar, con creces, el valor monetario del mismo. El diseño de bioprocesos para el aprovechamiento de la lactosa como recurso, con la generación de productos de mayor valor agregado, ha constituido un objetivo de muchos investigadores en las últimas décadas.

Una interesante posibilidad para el aprovechamiento del permeado es la producción de jarabes de lactosa hidrolizada, obteniéndose glucosa y galactosa, dos monosacáridos con mayor poder edulcorante y más solubles que la lactosa (Zhou y Dong-Chen, 2001). Este cambio en las propiedades permite el uso de los jarabes de glucosa-galactosa en un gran número de aplicaciones.

1.1. Hidrólisis de lactosa

La hidrólisis de la lactosa puede producirse por vía química o enzimática, las que emplean diferentes condiciones. En el proceso de hidrólisis química se emplean ácidos minerales, mientras que el proceso enzimático puede realizarse utilizando la enzima β -galactosidasa (β -galactósido galactohidrolasa, E.C. 3.2.1.23).

Los datos bibliográficos muestran que, cuando se emplea la hidrólisis ácida, la temperatura de reacción es mucho mayor que en el método enzimático (150°C y 30-40°C, respectivamente), produciendo colores y olores no deseados que limitan el uso de este proceso en la industria alimenticia. Por otro lado la hidrólisis enzimática, de acuerdo con la fuente de enzima elegida por su selectividad, puede aplicarse tanto en leche como en suero, sin tratamientos previos, obteniéndose un producto que preserva

las propiedades alimenticias del material crudo, aumentando su poder edulcorante. Teniendo en cuenta estas características, en la literatura se indica al método enzimático como el más conveniente para la industria alimenticia (Santos y col., 1998; Ladero y col., 2000; Creamer y col., 2002).

Muchas fuentes microbianas de la enzima son de interés industrial; no obstante, para aplicaciones en procesos de alimentos, solamente se realiza el cultivo de microorganismos considerados seguros por organismos internacionales, como las levaduras *Kluyveromyces lactis* y *fragilis*, y los hongos *Aspergillus niger* y *oryzae*. Las lactasas obtenidas de levadura presentan condiciones óptimas de trabajo cercanas a los 35-40°C de temperatura y pH entre 6,5 y 7,3, lo que las hace muy útiles para el tratamiento de leche (Giacomini y col., 1998). Por su parte, las provenientes de hongos filamentosos poseen un valor de pH óptimo entre 2,5 y 4,5, y una temperatura óptima de reacción entre 40 °C y 55 °C, siendo por tanto aptas para la hidrólisis de lactosa en suero ácido. Además, las enzimas fúngicas son más sensibles a la inhibición por galactosa que las de levadura; por ello no pueden alcanzar el grado de hidrólisis obtenido con estas últimas (Mahoney y Adamchuck, 1980).

Por su parte, la lactasa producida por la bacteria *Bacillus circulans* presenta una termoestabilidad superior a las lactasas de levadura, no requiere de cofactores metálicos para su actividad y posee un rango de condiciones de trabajo que resulta adecuado para todas las aplicaciones propias de la industria láctea (leche, suero de quesería y permeado de suero de quesería), a la vez de permitir trabajar a temperaturas que minimizan los riesgos de contaminación microbiana.

Por tal motivo, para el presente trabajo se optó por una preparación comercial soluble de la enzima β -galactosidasa de *Bacillus circulans* (Biolacta N 5, Daiwa Kasei, Japón) que presenta elevada estabilidad a pH entre 5,0 y 9,5, un pH óptimo de 6,0 y una temperatura óptima de 65°C. Esta enzima extracelular, tiene un peso molecular de

alrededor de 300.000 Da y la preparación comercial adoptada posee una actividad de 5.000 unidades de lactosa (LU) por gramo. Una LU se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por minuto a pH 6,0 y 40°C.

2. Inmovilización

La tecnología más simple para la hidrólisis enzimática de lactosa, se basa en el uso de la enzima parcialmente purificada, en procesos de tipo batch. Sin embargo, el costo de la enzima y la estabilidad del biocatalizador, restringen su uso masivo.

La inmovilización de la enzima en un soporte sólido ofrece ventajas, como permitir el reuso del biocatalizador, evitar la presencia de la enzima en los productos de la reacción y la posibilidad de desarrollar procesos de hidrólisis continua (Brena y Batista-Viera, 2006). Además, con frecuencia es posible obtener biocatalizadores más estables que la enzima en solución.

A pesar de que la inmovilización de enzimas presenta una serie de ventajas, no siempre es factible trabajar con una enzima inmovilizada. La aplicación de esta tecnología depende de distintos factores, entre los que se incluyen: la naturaleza y el costo del proceso, el método de inmovilización, el tipo de reactivos, la aparición de una nueva fase en el reactor, las restricciones difusionales del sistema, la vida útil del catalizador, el cambio de escala y el control del desarrollo microbiano durante el proceso.

Una etapa importante en la inmovilización de enzimas es la elección de un soporte y de un método de activación adecuados que permitan obtener una elevada concentración de grupos reactivos en la superficie del soporte que puedan interactuar con los grupos reactivos de la enzima.

2.1. Inmovilización covalente en soportes acrílicos epoxi-activados

Durante las últimas décadas han sido evaluados numerosos soportes, siendo las resinas acrílicas las más estudiadas (Grazú y col., 2003; Mateo y col., 2007). Estos soportes, por su congruencia geométrica, proporcionan condiciones ideales para la estabilización de la enzima, a la vez de permitir su activación con varios agentes activantes.

Entre los agentes activantes, los que despiertan mayor interés, tanto a escala de laboratorio como industrial, son los que incorporan grupos epóxido porque éstos son muy estables a pH neutro, aún en condiciones de humectación, por lo que pueden ser almacenados por largos períodos. Además, estos soportes epoxi-activados son capaces de reaccionar en condiciones suaves (pH cercano al neutro y alta fuerza iónica) con diferentes grupos nucleofílicos de la enzima, tales como los grupos amino, hidroxilo y/o tiol, con una mínima modificación química de la proteína (Mateo y col., 2007).

Dentro de estos tipos de soportes, se dispone de varias presentaciones comerciales, habiéndose seleccionado para este trabajo la resina acrílica epoxi-activada de la empresa Röhm-Pharma (Darmstadt, Alemania) comercializada con el nombre Eupergit C (Tabla 1). Estos soportes, son producidos por copolimerización de N,N'-metilen-bis-metacrilamida, glicidil metacrilato, alilglicidil éter y metacrilato (Katchalski-Katzir y Kraemer, 2000; Hernaiz y Crout, 2000; Boller y col., 2002).

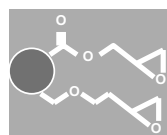
En condiciones de neutralidad y baja temperatura (4 a 25°C), la reacción covalente intermolecular directa entre la enzima y el soporte epoxi-activado es muy lenta. Para lograr una eficiente inmovilización covalente sobre este tipo de soportes, deben cumplirse dos etapas: en la primera, la enzima es adsorbida sobre la superficie del soporte. Por esta razón, la mayoría de los soportes comerciales de este tipo tienen carácter ligeramente hidrofóbico. Para forzar la adsorción hidrofóbica de las proteínas

sobre el soporte se requiere usar un medio con una elevada fuerza iónica (Mateo y col., 2000; Mateo y col., 2007). En la segunda etapa, la proteína previamente adsorbida se une covalentemente a los grupos epóxido del soporte (Figura 1).

Tabla 1. Características de los soportes comerciales Eupergit C.

Propiedad:

Tamaño de partícula:	170 μm
Contenido de grupos epóxido (oxirano):	> 600 $\mu\text{moles / g}$
Área superficial (BET):	4 m^2 / g
Volumen de poro:	0,06 cm^3 / g
Distribución de tamaño de poros:	100 – 500 Å
Contenido de agua:	4%
Factor de hinchamiento:	3,5 - 4



El proceso de inmovilización se desarrolla a temperatura ambiente y con agitación, incubando por 24 h una solución de la enzima con los soportes en buffer fosfato de potasio 1M pH 7,5. Después de la incubación, el derivado obtenido se separa de la mezcla de reacción por filtración, realizándose posteriormente sucesivos lavados con fosfato de potasio 1M pH 7,5, fosfato de sodio 0,1M pH 7,5 y fosfato de sodio 0,1M pH 6,0 (buffer de actividad). Los grupos reactivos remanentes se bloquean tratando a los derivados con 2-mercaptoetanol 0,2M pH 7,5 a 4°C por 4 horas.

La eficiencia del proceso de inmovilización puede ser determinada en función de dos parámetros operativos: el rendimiento de inmovilización, que es la relación entre la cantidad de enzima realmente inmovilizada y el total ofrecido en el proceso de inmovilización, y la eficiencia catalítica, que es la relación entre la actividad expresada por el derivado y la actividad efectivamente unida al soporte.

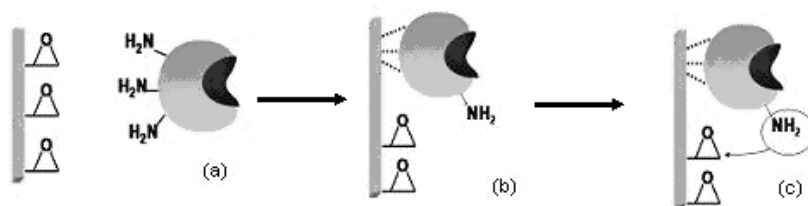
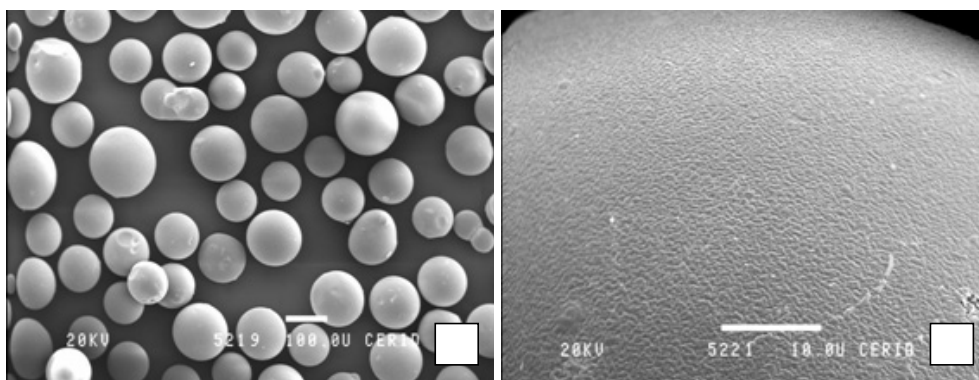


Figura 1. Mecanismo de inmovilización covalente sobre soportes epoxi-activados: soporte y enzima mostrando los grupos involucrados en la unión covalente (a), adsorción por regiones hidrofóbicas (b) y reacción covalente entre enzima y soporte (c).

Como resultado de la inmovilización de β -galactosidasa en Eupergit C se obtuvo un rendimiento de inmovilización del 88%, con una eficiencia catalítica del 91%.

La alta eficiencia catalítica alcanzada en el proceso de inmovilización se debe fundamentalmente a dos factores: al leve efecto sobre la estructura terciaria de la enzima que se ejerce a través de la unión covalente de ésta con los grupos epóxido del soporte, y a la congruencia geométrica del soporte Eupergit C evidenciada por la uniformidad de las características superficiales del biocatalizador β -galactosidasa–Eupergit C comprobadas en las observaciones microscópicas realizadas (Figura 2).



2.2. Caracterización y aplicaciones del biocatalizador β -galactosidasa–Eupergit C

Las causas de pérdida de actividad de una enzima son difíciles de determinar en forma individual, por lo que resulta conveniente evaluarlas conjuntamente (Henley y Sadana, 1986; 1989). El modelo más utilizado por su simplicidad, considera la disminución de actividad en el tiempo como una reacción irreversible de primer orden. El efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima es el resultado de un proceso combinado de efectos opuestos (activación-desnaturalización). Un aumento de temperatura beneficia a la velocidad de formación de producto (k_2), a la vez que favorece, del mismo modo, la desnaturalización de la proteína (k_d), ya que ambas siguen la ley de Arrhenius, y tienen influencia sobre el equilibrio en la formación del complejo enzima-sustrato.

La variabilidad de las constantes cinéticas con la temperatura puede expresarse a través de las siguientes ecuaciones:

$$\ln (K_m) = - \frac{\Delta H}{R T} \quad (4)$$

$$k_2 = A_1 e^{-E_{a1}/R T} \quad (5)$$

$$k_d = A_2 e^{-E_{a2}/R T} \quad (6)$$

donde ΔH es un factor entálpico que regula el equilibrio químico involucrado en la constante de Michaelis-Menten, A es el factor pre-exponencial de la ecuación de Arrhenius, E_a es la energía de activación de la reacción, R es la constante universal de los gases y T es la temperatura absoluta.

La actividad β -galactosidasa de la enzima soluble se determina midiendo espectrofotométricamente a 405 nm la cantidad de ONP liberado por 100 μ l de la solución de enzima, usando como sustrato una solución 10 mM de ONPG en buffer fosfato de sodio 0,1M a pH 6,0 (buffer de actividad) y a temperatura ambiente. Una

unidad de enzima (UE) se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1 μ mol de ONPG por minuto bajo las condiciones de ensayo.

Por su parte, la actividad β -galactosidasa de la enzima inmovilizada se determina midiendo espectrofotométricamente a 405 nm la cantidad de ONP liberado por 100 μ l de suspensión con 3 ml de una solución 22 mM de ONPG en buffer de actividad, usando una cubeta de 1cm de paso óptico con agitación magnética incorporada.

La actividad lactásica de la enzima soluble e inmovilizada se determina a temperatura ambiente, usando como sustrato una solución de lactosa (50 g/l) en buffer fosfato de sodio 0,1M de pH 6,0 y determinando la cantidad de glucosa formada por el método de Trinder, mediante un kit que contiene glucosa oxidasa y peroxidasa (Trinder, 1969).

El resultado de la caracterización cinética realizada con la enzima soluble e inmovilizada en Eupergit C se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros termodinámicos de la enzima libre e inmovilizada.

Enzima	Parámetro	A_i	Ea_i	ΔH
soluble	V_{max}^0	$1,240 \times 10^6 \mu\text{M}/\text{min}$	$1,312 \times 10^4 \text{ cal}/\text{mol}$	---
	k_d	$1,117 \times 10^6 \text{ 1/h}$	$9,336 \times 10^3 \text{ cal}/\text{mol}$	---
	Km	---	---	$1,769 \times 10^3 \text{ cal}/\text{mol}$
inmovilizada	V_{max}^0	$6,805 \times 10^5 \mu\text{M}/\text{min}$	$1,291 \times 10^4 \text{ cal}/\text{mol}$	---
	k_d	$1,476 \times 10^6 \text{ 1/h}$	$1,133 \times 10^4 \text{ cal}/\text{mol}$	---
	Km	---	---	$2,337 \times 10^3 \text{ cal}/\text{mol}$

Asimismo, a fin de posibilitar la comparación de distintos biocatalizadores, se determina el tiempo de vida media, $\theta^{1/2}$, que es el tiempo en que la actividad enzimática del biocatalizador disminuye hasta la mitad de su valor inicial, para cada condición de reacción. Para la enzima inmovilizada, este valor en relación con el correspondiente a la enzima soluble es tomado como un control de la estabilización lograda por el proceso de inmovilización (Wiseman, 1991). Los valores de $\theta^{1/2}$ obtenidos para la

enzima soluble y para la enzima inmovilizada se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores de tiempo de vida media para la enzima libre e inmovilizada.

Temperatura (°C)	$\theta^{1/2}$ (h)	
	soluble	inmovilizada
30	6,50	60,00
40	3,45	42,00
50	1,35	21,00

Empleado en condiciones de operación en procesos por lotes a escala laboratorio, el derivado β -galactosidasa–Eupergit C se usó con éxito en la hidrólisis de lactosa (50 g/l) en soluciones buffer y permeados de lactosuero, alcanzando altos grados de conversión. Empleando una cantidad de derivado con una actividad equivalente a 2,5 UE para producir la hidrólisis en 300 ml de una solución de lactosa (50 g/l) en buffer fosfato de sodio 0,1M a pH 6,0 y a 50°C, al cabo de 72 horas se alcanzó una conversión del 92%.

Por otra parte, en un ensayo de similares características usando permeado de suero de quesería, se ensayó una cantidad de derivado con una actividad equivalente a 2,5 UE para producir la hidrólisis en 300 ml de permeado diluido (50 g/l de lactosa), ajustado a pH 6,0 y a una temperatura de 50°C, obteniéndose para 72 horas de operación una conversión del 77%. Al cabo de dicho tiempo de operación, la actividad residual se ubicó en aproximadamente el 40% de la actividad inicial.

2.3. Entrampado

Como pudo observarse, bajo las condiciones de operación ensayadas, el derivado β -galactosidasa–Eupergit C mostró un promisorio comportamiento, resultando por tanto interesante poder evaluar su aplicabilidad a escala industrial. En una primera instancia, el mayor inconveniente para esta utilización radica en el tamaño de partícula del

soporte. Por tal motivo, buscando mejorar su adaptabilidad a diferentes escalas y configuraciones de trabajo, sin disminuir su estabilidad operacional, se analizaron dos posibles estrategias para emplear el derivado: entrapar las partículas del derivado β -galactosidasa–Eupergit C dentro de una membrana de diálisis adecuada para permitir la realización de la reacción de hidrólisis, o entrapar las partículas de derivados β -galactosidasa–Eupergit C en esferas de alginato de calcio.

La estrategia del entrapado en una membrana se desarrolló encerrando una determinada cantidad del derivado β -galactosidasa–Eupergit C (entre 9,0 y 14,0 UE) en el interior de una membrana tubular de diálisis de 1000 Da de tamaño molecular de corte nominal, la que se dispone convenientemente sobre las paletas del agitador mecánico responsable de producir el mezclado del medio reaccionante. En dicho dispositivo, se ensayó la hidrólisis de lactosa en sendas alícuotas de 300 ml de solución de lactosa en buffer fosfato de sodio 0,1 M, de permeado de lactosuero y de leche descremada, todas convenientemente ajustadas para mantener el tenor inicial de lactosa (50 g/l), el pH en 6,0 y la temperatura en 50 °C.

Empleando una cantidad de derivado con una actividad equivalente a 10,0 UE para producir la hidrólisis en un sistema batch con 300 ml de una solución de lactosa (50 g/l) en buffer fosfato de sodio 0,1M a pH 6,0 y a 50 °C, al cabo de 20 horas se alcanzó una conversión del 90%.

En ensayos similares, empleando una cantidad de derivado con una actividad equivalente a 9,0 UE y 9,3 UE para producir la hidrólisis en 300 ml de permeado diluido (5 g/l de lactosa) y leche descremada (5,1g/l de lactosa), ambos ajustados a pH 6,0 y a una temperatura de 50 °C, se obtuvieron para 20 horas y 14 horas de operación conversiones del 88% y del 53%, respectivamente.

A su vez, pudo observarse que la presencia de la membrana de diálisis afectó de forma poco significativa los niveles de conversión alcanzados, evidenciando que no

existe un efecto de concentración del inhibidor galactosa en un sistema como el descrito, en relación al batch control sin membrana de diálisis.

Por otra parte, la recuperación de actividad tras el uso del biocatalizador en este sistema está en el entorno del 50-70%, lo cual permitió un ciclo adicional de reutilización respecto al obtenido en el batch control, donde los niveles de conversión alcanzados resultaron comparables al primer uso.

No obstante los buenos resultados obtenidos con el entrapado del biocatalizador β -galactosidasa–Eupergit C en una membrana de diálisis, su aplicabilidad a escalas mayores depende de las membranas tubulares disponibles comercialmente, las que incrementan considerablemente su costo a medida que aumenta su diámetro.

La estrategia de entrapado del derivado β -galactosidasa–Eupergit C en perlas de alginato de calcio se desarrolló realizando algunas modificaciones al procedimiento descrito por Yadav y Jadhav para el entrapado de lipasa preinmovilizada en sílica mesoporosa hexagonal (Mammarella y Rubiolo, 1996; Yadav y Jadhav, 2005). Se prepararon diversas soluciones acuosas de alginato de sodio al 4% (p/v), a la que se incorporaron bajo agitación vigorosa, cantidades preestablecidas del derivado β -galactosidasa–Eupergit C de manera de formar una serie de suspensiones uniformes.

Usando una bomba peristáltica, a cada una de esas suspensiones se las hizo gotear, a través de una aguja hipodérmica, sobre una solución 0,1 M de CaCl_2 . El calibre de la aguja hipodérmica y la regulación del caudal de goteo permiten variar el tamaño final de la partícula de biocatalizador entre 2 y 4 mm. A medida que se produce la gelificación, las esferas van perdiendo su apariencia traslúcida para tornarse semiopacas. Las esferas de biocatalizadores, fueron extraídas del baño gelificante después de 1 hora, lavadas con agua destilada y colocadas en agua destilada en la heladera (aproximadamente a 4 °C).

Para analizar la efectividad del proceso de entrapado, se realizó la observación por microscopía electrónica de barrido de los biocatalizadores obtenidos, sometiéndolos previamente a un proceso de deshidratación por liofilización. Por tratarse de hidrogeles con más del 90% de agua en su composición, el proceso de liofilización afectó sustancialmente la forma y tamaño de las partículas pero permitió realizar la observación microscópica para verificar la incorporación completa y efectiva del derivado β -galactosidasa-Eupergit C en la matriz de alginato, lo que impide su lixiviación al medio de reacción (Figura 3).

La resistencia mecánica del hidrogel puede variar con las condiciones a que es sometido durante la reacción (tiempo-temperatura) y al contacto del mismo con el medio reaccionante, factores que pueden producir efectos de hinchamiento y debilitamiento de la estructura del soporte con la subsecuente pérdida de la enzima inmovilizada. Por lo cual se realizó un análisis comparativo del cambio operado en el biocatalizador, cuando es mantenido en condiciones similares a las de reacción, contrapuesto al de un control mantenido en agua a 4°C, que no experimenta cambios en su apariencia, ni liberación de calcio. Sobre los mismos se realizó un seguimiento del aspecto macroscópico visual de las partículas, así como un seguimiento de la pérdida de calcio, que es el agente responsable del mantenimiento de la estructura de la matriz del gel.

La pérdida de calcio al medio de reacción fue seguida a través de un kit colorimétrico para la determinación directa de calcio sérico y urinario (Wiener Laboratorios S.A.I.C., Rosario, Argentina). La detección se realiza con cresolfaleína complexona que reacciona con el calcio a pH 11, dando un complejo coloreado, cuya intensidad de color se mide en un espectrofotómetro a 570 nm. La presencia de hidroxiquinoleína en el reactivo evita la interferencia que produce el magnesio (Gindler y King, 1972).

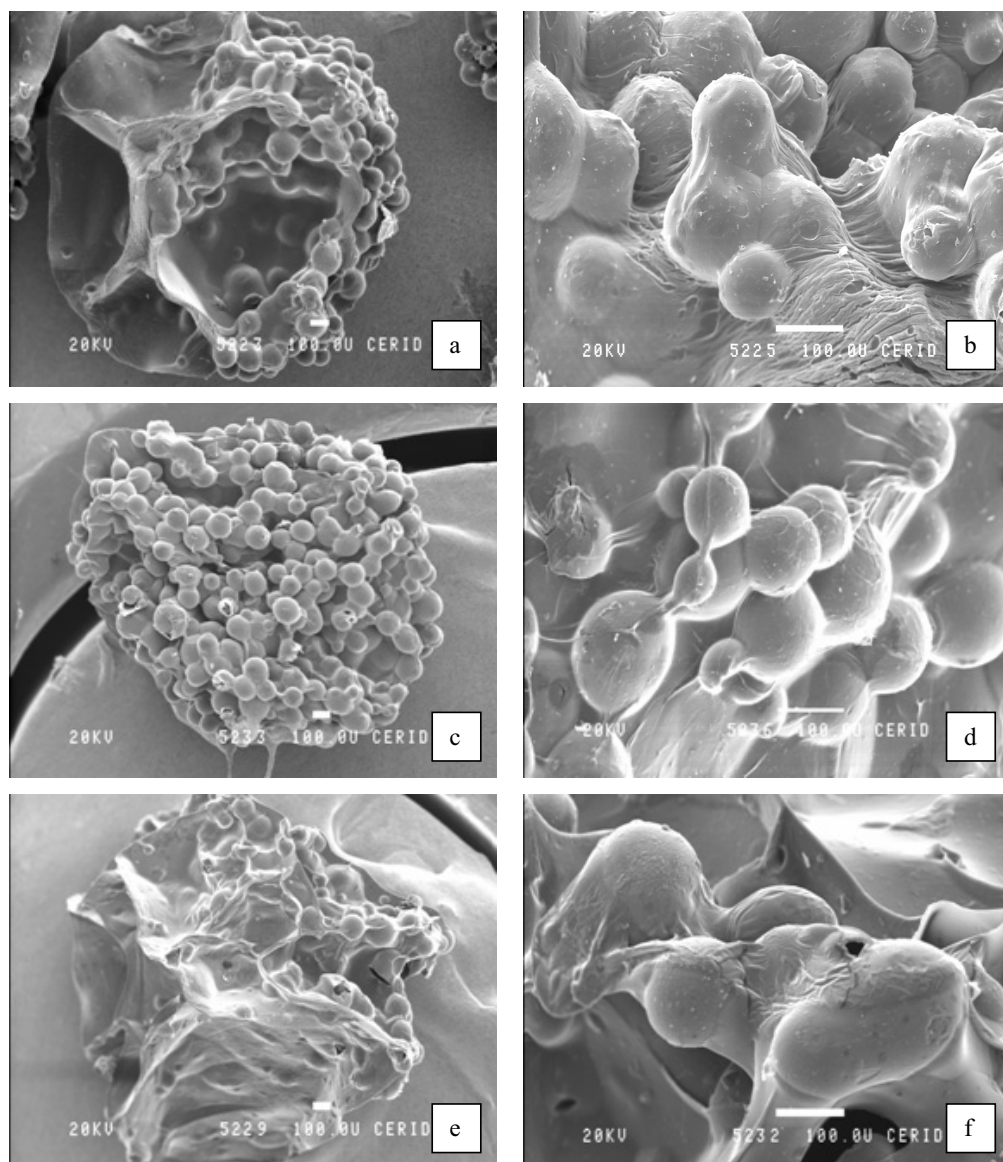


Figura 3. Microscopía electrónica de barrido del biocatalizador β -galactosidasa-Eupergit C entrampado en alginato de calcio sin utilizar a 54x (a) y 200x (b), después de utilizarlo en ensayos de hidrólisis máxima con solución de lactosa a 48x (c) y 200x (d) y después de utilizarlo en ensayos de hidrólisis máxima con permeado de suero de quesería a 48x (e) y 200x (f).

En vistas de la posible liberación de calcio desde la partícula de alginato al medio, se realizó un estudio de la cinética de liberación de calcio correspondiente a 200 mg de derivado entrampado incubados en buffer fosfato de sodio 0,1 M a una temperatura de 50°C y pH entre 5,5 a 8,0 y se siguió por un período de 24 horas. No se evidenció liberación de calcio durante las primeras 9 horas para ninguno de los pH ensayados. Tras 24 horas de incubación todas las muestras exhibieron deformaciones de las partículas de alginato, siendo las más afectadas las esferas que se colocaron en pH 7,5 y 8,0, donde se obtuvieron los valores más altos de liberación de calcio. El control no presentó deformaciones ni liberación de calcio después de 24 horas, evidenciando el efecto de secuestro de calcio por parte del fosfato del buffer.

Se realizó un ensayo similar, pero colocando las partículas en buffer suplementado con cloruro de magnesio de 0,025 a 0,1 M, para pH 6,0 y 7,5. Después de 24 horas las esferas colocadas a pH 6,0 no mostraron deformación ni liberación de calcio para ninguna de las concentraciones de cloruro de magnesio empleadas. Las partículas que se mantuvieron en pH 7,5 mostraron deformación y liberación de calcio. Sin embargo, para una concentración de cloruro de magnesio de 0,1M no se evidenció deformación y la liberación de calcio resultó menos importante.

Asimismo, se siguió la liberación de calcio a lo largo de los ensayos de lactólisis llevados a cabo con el biocatalizador en lecho empacado (realizados a pH 6,0 y con permeado). Después de 48 horas de operación la liberación de calcio se ubicó en menos del 20%, verificándose sólo un ligero incremento del volumen de la partícula, sin cambios significativos en sus propiedades funcionales.

2.4. Aplicaciones de los derivados entrampados

A continuación, se estudió la influencia de la carga de derivado Biolacta–Eupergit C entrampado en las partículas de gel sobre el grado de hidrólisis obtenido. Para tal fin

se prepararon biocatalizadores de 3,0 mm de diámetro, con cargas de 10, 20 y 30 mg de derivado β -galactosidasa–Eupergit C por ml de alginato. Los biocatalizadores obtenidos se empacaron en un reactor tubular de 57,8 cm³ de volumen total y una relación L/D de 340/14, equipado con camisa calefactora y baño de recirculación. Empleando una bomba peristáltica, el reactor fue alimentado en reciclo total con 300 ml de permeado diluido (50 g/l de lactosa) ajustado a pH 6,0, manteniendo un caudal constante de alimentación de 30 ml/h y una temperatura de operación de 50 °C. Para cargas de 10 mg/ml, después de 80 horas de operación se alcanzó una conversión del 85%, mientras que para cargas de 20 mg/ml y 30 mg/ml la conversión final alcanzada fue de 84%, obtenida en 50 y 32 horas de operación, respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. Influencia de la carga de derivado entrampado sobre el grado de hidrólisis.

Carga (mg/ml de alginato)	Actividad incorporada (UE)	Tiempo de operación (h)	Conversión obtenida (%)	Actividad recuperada (%)
10	4,6	80	85	48
20	9,0	50	84	53
30	13,6	32	84	61

Como puede observarse, no se evidenciaron diferencias significativas respecto al grado de conversión alcanzado, por cuanto se concluye que el entrampado no produce un efecto de concentración del inhibidor galactosa en las cercanías de la enzima. Asimismo, analizando el tiempo de operación necesario para alcanzar el máximo grado de hidrólisis puede observarse que existe una relación prácticamente lineal entre este parámetro y la carga de derivado ($r^2 = 0,9796$), lo que evidencia que la incorporación de cargas diferentes al entrampado no involucra una modificación en la resistencia a la difusión del sustrato.

Por otra parte, a medida que aumenta la carga del derivado β -galactosidasa–Eupergit C en el biocatalizador, para alcanzar un mismo nivel de conversión se los debe mantener en condiciones de reacción por menos tiempo. Esta relación prácticamente lineal entre la actividad recuperada y la carga de derivado ($r^2 = 0,9826$), evidencia que el modelo de desactivación térmica adoptado representa adecuadamente este proceso en las condiciones de operación escogidas.

Asimismo, para analizar el grado de resistencia a la difusión que experimenta el sustrato cuando el derivado β -galactosidasa–Eupergit C es entrampado en una matriz de 4% de alginato, se realizaron ensayos de hidrólisis en el mismo reactor que se usó anteriormente, con biocatalizadores de diferentes tamaños. Para tal fin se prepararon biocatalizadores con la misma cargas (30 mg de derivado β -galactosidasa–Eupergit C por ml de alginato), los que se ensayaron el tiempo necesario para alcanzar el mismo grado de conversión (84%), determinando la actividad remanente del biocatalizador para los distintos diámetros empleados (Tabla 5). Al final del ensayo de hidrólisis se obtuvo una relación prácticamente lineal ($r^2 = 0,9842$) entre la actividad recuperada (Y) y diámetro de la partícula de biocatalizador (X) de la forma, $Y = A + B X$, con $A = 15,071$ y $B = 5,857$, lo que indica que el proceso difusivo es uniforme, posiblemente debido a la también uniforme distribución del derivado β -galactosidasa–Eupergit C en el interior de la partícula de biocatalizador.

Tabla 5. Influencia del tamaño del biocatalizador sobre el grado de hidrólisis.

Diámetro (mm)	Actividad incorporada (UE)	Tiempo de operación (h)	Actividad recuperada (%)
2,0	13,0	27	67
3,0	13,3	32	61
3,5	13,6	36	63

Carga de derivado: 30 mg de β -galactosidasa-Eupergit C/ml de alginato

Por otra parte, comparando los tiempos de operación necesarios para alcanzar un mismo grado de hidrólisis, usando una misma carga de derivado β -galactosidasa–Eupergit C entrampado en alginato de calcio y sin entrampar, se observa que el entrampado introduce una resistencia adicional al proceso difusivo que representa un incremento de alrededor del 20% en dichos tiempos.

A fin de analizar las condiciones de reutilizabilidad de los biocatalizadores producidos por entrampado, se procedió a comparar la calidad de la superficie externa de los mismos antes y después de utilizarlos en ensayos de hidrólisis hasta alcanzar el máximo de conversión posible con solución de lactosa (50 g/l) en buffer fosfato de sodio 0,1M y permeado diluido (50 g/l de lactosa), ambos ajustados a pH 6,0 y sometidos a una temperatura constante de 50°C. Este análisis se realizó a través de la observación por microscopía electrónica de barrido de muestras de biocatalizadores sometidos previamente a un proceso de deshidratación por liofilización. Por tratarse de hidrogeles con más del 90% de agua en su composición, el proceso de liofilización afectó sustancialmente la forma y tamaño de las partículas pero posibilitó realizar la observación microscópica para verificar que el aspecto superficial del biocatalizador no cambia durante el proceso de operación, ni se verifican depósitos importantes de sustancias extrañas cuando se emplea solución de lactosa o permeado de suero de quesería (Figura 3). Esta verificación permite evitar la necesidad de la implementación de un proceso profundo de limpieza o reactivación de la superficie del biocatalizador previo a su reutilización, con la consecuente disminución de tiempos muertos y costos extras que conspirarían contra su aplicabilidad industrial.

En función de estos resultados, se sometió el derivado β -galactosidasa–Eupergit entrampado en una matriz de alginato al 4% a un ciclo de reutilización hasta alcanzar el máximo grado de hidrólisis posible, usando permeado diluido (50 g/l de lactosa), ajustado a pH 6,0 y a una temperatura de operación de 50 °C. En dicho ensayo se

alcanzó una conversión máxima del 83%, comparable al 84% obtenido durante la primera utilización, pero necesitando para ello un mayor tiempo de operación del reactor (50 horas). La desactivación ocurrida en esta nueva aplicación fue similar a la sufrida en la primera oportunidad.

Por tanto, dado el buen desempeño que mostraron los biocatalizadores producidos por el atrapamiento del derivado Biolacta–Eupergit C en una matriz de alginato de calcio, sumado a la posibilidad de producir con el equipamiento disponible en el laboratorio, un escalamiento casi continuo del mismo para tamaños entre 1,1 y 5,5 mm, se planificaron diferentes ensayos usando como sustrato solución de lactosa, permeado y leche descremada y variando los caudales de alimentación del reactor.

Se desarrollaron nuevos ensayos con el derivado atrapado en un reactor de lecho empacado a 50°C, empleando caudales de alimentación de 20 ml/h y 30ml/h y usando solución de lactosa, permeado y leche descremada como sustrato, ajustados a pH 6,0 y con el mismo tenor inicial de lactosa (50 g/l). Empleando el menor caudal de alimentación se obtuvieron conversiones máximas de 86% para lactosa y 84% para permeado y leche descremada, todas para alrededor de las 24 horas de operación, mientras que para un caudal de alimentación mayor se obtuvieron conversiones máximas similares (alrededor del 84%) para todos los casos, y para tiempos de operación similares (alrededor de las 32 horas). Además de la diferencia en el grado máximo de hidrólisis obtenido para los diferentes sustratos cuando se alimenta el reactor con el caudal más bajo ensayado (20 ml/h), del mismo modo que ocurre cuando se emplea el derivado β -galactosidasa–Eupergit C sin atrapar; se observó en todos los casos una menor actividad residual del biocatalizador (alrededor del 50%) en comparación con la obtenida en todos los casos para el proceso a mayor caudal (alrededor del 60%).

La comparación del desempeño alcanzado con el derivado β -galactosidasa–Eupergit

C sin entrapar y entrapado en una matriz de alginato al 4% se puede observar en la Figura 4. Como puede observarse en dicha figura, los resultados sugieren una mayor estabilidad operacional de los derivados entrapados, probablemente debido a una menor temperatura real en el interior de la partícula.

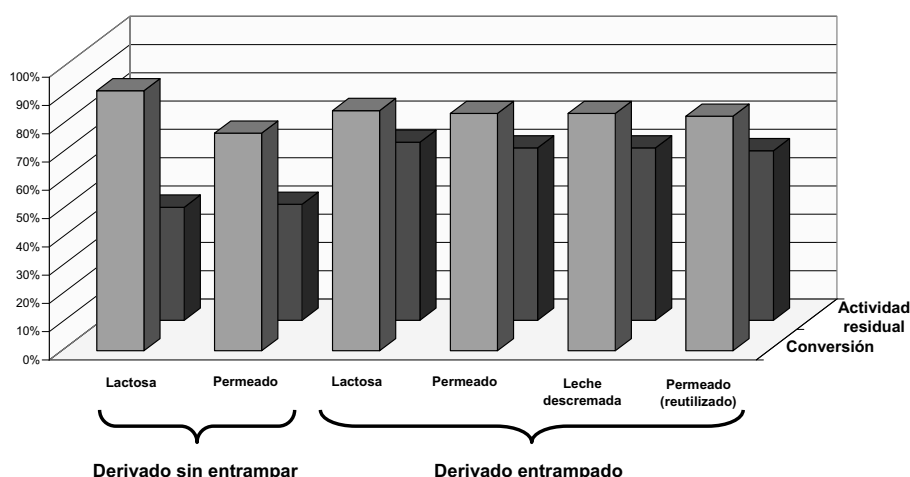


Figura 4. Comparación de los resultados obtenidos con el derivado β -galactosidasa-Eupergit C libre y entrapado, ensayados con diferentes sustratos.

Conclusiones

El derivado β -galactosidasa-Eupergit C mostró estabilidades operacionales promisorias, bajo las condiciones empleadas en este trabajo, pudiéndose obtener conversiones del 77-92% con lactosa en buffer y permeado de lactosuero.

La presencia de una membrana de diálisis afectó de forma poco significativa los niveles de conversión alcanzados, evidenciando que no existe un efecto de concentración del inhibidor galactosa en un sistema como el descrito, en relación al batch control sin membrana de diálisis. La recuperación de actividad tras el uso fue superior al 50%, lo cual permitió un ciclo adicional de reutilización, con niveles de conversión comparables. Los niveles de conversión obtenidos con lactosa (50 g/l)

resultaron superiores a aquellos obtenidos con permeados en todos los reactores en batch.

Por su parte, los biocatalizadores desarrollados en base a beta-galactosidasa de *Bacillus circulans* por inmovilización de la enzima en soportes acrílicos y posterior atrapado en esferas de alginato, exhibieron adecuadas propiedades funcionales para la bioconversión de lactosa en buffer y permeados. Los niveles de conversión obtenidos con lactosa (50 g/l) resultaron comparables a aquellos obtenidos con permeados en el caso de este sistema. El atrapado en alginato, no generó retardos difusionales, mostrando los derivados buena estabilidad mecánica en las condiciones de operación.

De los resultados podría desprenderse una mayor estabilidad operativa de los derivados atrapados, si bien la comparación se realizó con los resultados de los correspondientes reactores en batch. Probablemente en el interior de las partículas la temperatura alcanzada sea inferior a la temperatura de operación. Los niveles de conversión obtenidos con lactosa en los sistemas en batch fueron superiores a aquellos obtenidos con permeado. En el caso del sistema en lecho empacado se obtuvieron conversiones comparables operando con lactosa y permeado.

La microscopía electrónica reveló que las partículas acrílicas se encuentran encerradas en una red de alginato, ambiente que podría protegerlas en cierta medida del medio. La microscopía dejó en evidencia además las diferencias existentes entre las redes de alginato en torno a la partícula acrílica en los casos de operación con lactosa en buffer y con permeado.

La estrategia de atrapado de la enzima inmovilizada covalentemente, proporciona nuevas aplicaciones para estos derivados enzimáticos, eliminando la pérdida que resulta del atrapado de la enzima directamente en la matriz de alginato, así como los inconvenientes relacionados con el reducido tamaño de partícula en el caso de la inmovilización en resinas acrílicas comerciales. De los estudios realizados se puede

inferir que resulta factible planificar un nuevo escalamiento del proceso con el derivado entrampado con vistas a completar los estudios de aplicabilidad a escala industrial.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo recibido del CYTED (Proyecto A.1.2.), del PEDECIBA-Química y de la ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación). También se agradece por el generoso suministro de Eupergit C a Röhm-Pharma (Darmstadt, Alemania) y de Biolacta N-5 a Daiwa Kasei (Osaka, Japón).

Referencias

- Alkhatim, H.S., Alcaina, M.I., Soriano, E., Iborra, M.I., Lora, J., Arnal, J. (1998). Treatment of whey effluent from dairy industries by nanofiltration membranes. *Desalination*, 119, 177-184.
- Boller T., Meier C., Menzler S. (2002). Eupergit oxirane acrylic beads: how to make enzymes fit to biocatalysis. *Organic Process Research and Development*, 6, 509-519.
- Brena B., Batista-Viera F. (2006). Enzyme Immobilization Methods 1965-1995: a literature survey. In: J.M. Guisán, *Methods in Biotechnology* (Vol. 22): *Immobilization of enzymes and cells*, 2nd Edition (pp. 15-30). Totowa: Humana Press Inc.
- Byrne E., Fitzpatrick J. (2002). Investigation of how agitation during precipitation, and subsequent processing affects the particle size distribution and separation of α -lactalbumin enriched whey protein precipitates. *Biochem. Eng. J.*, 10, 17-25.
- Creamer L.K., Pearce L.E., Hill J.P., Boland M.J. (2002). Milk and dairy products in the 21st century. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 7187-7193.
- Giacomini C., Villarino A., Franco Fraguas L., Batista-Viera F. (1998). Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods. *J. Mol. Catal.*, 4, 313-327.
- Gindler M., King J.D. (1972). Rapid colorimetric determination of calcium in biologic fluids with methylthymol blue. *Amer. J. Clin. Path.*, 58, 376-382.
- Grazú V., Abian O., Mateo C., Batista-Viera F., Fernández-Lafuente R., Guisán J.M. (2003). Novel bifunctional epoxy/thiol-reactive support to immobilize thiol containing proteins by the epoxy chemistry. *Biomacromolecules*, 4, 1495-1501.
- Henley S., Sadana T. (1986). Deactivation theory. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 1277-1285.
- Henley S., Sadana T. (1989). Graphical determination of mean activation theory energy and standard deviation in a microheterogeneity model of enzyme deactivation. *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 916-923.
- Hernaiz M.J., Crout D.H.G. (2000). Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *Bacillus circulans* and an α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enz. Microb. Technol.*, 27, 26-32.
- Katchalski-Katzir E., Kraemer D.M. (2000). Eupergit®, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 10, 157-176.
- Mahoney R., Adamchuk C. (1980). Effect of milk constituents on the hydrolysis of lactose by lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Food Sci.*, 45, 962-964 y 968.

- Mammarella E.J., Rubiolo A.C. (1996). Response Surface Methodology to Optimize β -Galactosidase Immobilization Using a Combination of Hydrocolloids as the Supporting Matrix. *Biotech. Progress*, 12, 612-617.
- Mateo C., Grazú V., Pessela B., Montes, T., Palomo, J., Torres, R., López-Gallego F., Fernández-Lafuente R., Guisán J. (2007). Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization. *Biochemical Society Transactions*, 35, 1593-1601.
- Santos A., Ladero M., García-Ochoa F. (1998). Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enz. Microb. Technol.*, 22, 558-567.
- Smithers G.W., Copeland A.D. (1997). International Whey Conference. *Trends Food Sci. Technol.*, 9, 119-123.
- Trinder P. (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.*, 6, 24-27
- Wiseman A. (1991). *Manual de biotecnología de los enzimas*. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.
- Yadav G.D., Jadhav S.R. (2005). Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate. *Microporous and mesoporous materials*, 86, 215-222.
- Zall, R.R. (1992). Sources and composition of whey and permeate. In J.G. Zadow, *Whey and lactose processing*. (pp. 1-72). New York: Elsevier.
- Zhou Q., Dong-Chen X. (2001). Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochem. Eng. J.*, 10, 33-40.

Ingeniería enzimática de β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* para su aplicación en procesos de transglicosilación de lactosa.

Cecilia Giacomini*, Gabriela Irazoqui*, Beatriz M. Brena, Francisco Batista-Viera.

* ambas contribuyen igualmente

Cátedra de Bioquímica. Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República. Gral. Flores 2124. CC 1157, Montevideo, Uruguay.

Tel. +59829241806, fax +59829241906,

e-mail: fbatista@fq.edu.uy

1. Introducción

La industria láctea genera miles de toneladas de lactosuero por año como subproducto de la fabricación de queso. Hoy en día el mismo es mayormente descartado generando grandes problemas ambientales debido a su alta demanda biológica de oxígeno. Una alternativa para un mejor aprovechamiento del lactosuero es la biotransformación de la lactosa (β -D-galactopiranosil (1 $\rightarrow$ 4) D-glucopiranososa), componente principal del mismo, para generar galactósidos de alto valor agregado. Los galactósidos han cobrado importancia en los últimos años debido a su participación en múltiples procesos biológicos (Bucke y col.(1996); Varki y col.(1999)). Dentro de los galactósidos podemos encontrar los galactooligosacáridos, oligosacáridos no digeribles compuestos de 2 a 20 moléculas de galactosa y una de glucosa (Miller y col. (2000)). Estos presentan propiedades prebióticas y otras propiedades benéficas para la salud tales como reducción de los niveles plasmáticos de colesterol en suero, actividad antitumoral y un aumento de absorción del calcio de la dieta. (Rycroft y col.(2001); Rastall y col.(2002); Maugard y col.(2003); Klewicki y col.(2004); Sanz y col.(2005))

Por otro lado se encuentran los galactósidos de bajo peso molecular constituidos por una unidad de galactosa unida a una aglicona, que en muchos casos presentan interesantes propiedades biológicas. Los alquilgalactósidos, debido a sus propiedades tensoactivas son utilizados como tensoactivos no iónicos, efectivos como agentes solubilizantes de membranas, fácilmente removibles por diálisis, biodegradables y no tóxicos (Ducret y col. (2002); Das-Bradoo y col.(2004)). La galactosil-xilosa puede ser utilizada como medio de diagnóstico para la evaluación de la actividad de la lactasa intestinal, mediante la cuantificación de xilosa eliminada en orina (Hara y col.(2000)). El glucosil-glicerol y galactosil-glicerol presentan actividad antitumoral (Colombo y col.(1996 y 2000), para la lactulosamina se ha reportado potencial actividad anticancerígena (Rabinovich y col.(2006)) y existen galactosil-aldoximas capaces de inhibir galectinas (Tejler y col.(2005)).

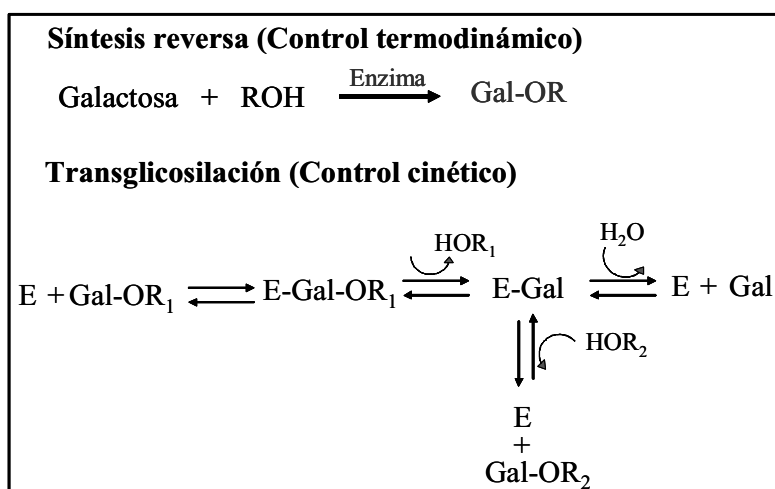
1.1. Glicosidasas

El uso de enzimas en procesos de síntesis de glicósidos es una alternativa interesante a la síntesis química tradicional ya que la formación de enlaces glicosídicos ocurre en un solo paso de reacción, evitando los pasos de protección y desprotección necesarios en la síntesis química y con un control completo de la configuración del centro anómico (Crout y col. (1990)). La síntesis enzimática de glicósidos puede realizarse utilizando glicosiltransferasas o glicosidasas. Las primeras permiten una transferencia regioselectiva y altos rendimientos de glicosilación, pero a costa de la utilización de nucleótidos caros como donadores o de su generación in situ mediante la utilización de una maquinaria compleja adicional. Las glicosiltransferasas son altamente selectivas respecto a los aceptores de grupos glicosilo y la glicosilación raramente ocurre sobre sustratos exógenos o modificados. Por el contrario las glicosidasas catalizan la formación de glicósidos anoméricamente puros sin la necesidad de cofactores. In vivo catalizan la reacción inversa, es decir la hidrólisis de glicósidos,

pero in vitro pueden ser utilizadas con fines sintéticos. Además las glicosidasas son robustas, se encuentran ampliamente disponibles en la naturaleza y son relativamente baratas. Existen glicosidasas que preservan la estereoquímica del centro anomérico del glicósido y otras que lo invierten. Sin embargo la mayoría de las glicosidasas utilizadas con fines sintéticos mantienen la configuración del carbono anomérico. Ejemplos de este caso son las enzimas β -galactosidasa, invertasa y lisozima. Las glicosidasas que invierten la configuración como la trealasa y la α -amilasa raramente han sido utilizadas para la síntesis de glicósidos (Ichikawa y col.(1992); Palcic y col.(1999); Van Rantwijk y col. (1999)).

Se han empleado dos métodos para la síntesis de glicósidos catalizada por glicosidasas (Figura 1): la **síntesis reversa** (controlada termodinámicamente) y la **transglicosilación** (controlada cinéticamente).

Figura 1. Mecanismos de síntesis enzimática de glicósidos.



En el caso de la síntesis reversa, se revierte la reacción de hidrólisis del glicósido haciendo reaccionar un monosacárido libre con un nucleófilo. La constante de equilibrio de esta reacción favorece a la hidrólisis respecto a la síntesis, por lo que hay que buscar una forma de revertir el equilibrio como por ejemplo altas concentraciones

de monosacáridos y el uso de co-solventes orgánicos. Este método se ve dificultado por la incompatibilidad entre la necesidad de un medio orgánico para disminuir la actividad del agua y la baja solubilidad de los monosacáridos en dicho medio.

El mecanismo de transglicosilación utiliza un donador de un grupo glicosilo activado (oligosacárido o glicósido activado) para formar un intermediario enzima-grupo glicosilo que reacciona con agua para dar los productos de hidrólisis, o con otro nucleófilo aceptor (alcohol, monosacárido, oligosacárido, aminoácido, nucleósido) para formar un nuevo glicósido u oligosacárido. Este nuevo producto obtenido puede ser también sustrato de la enzima y por lo tanto hidrolizado, por lo cual la reacción debe ser detenida antes de que esto ocurra. El rendimiento de la reacción de síntesis del glicósido queda entonces determinado mediante un balance entre las velocidades de síntesis y de hidrólisis. Las transglicosilaciones generalmente dan mayores rendimientos que las síntesis reversas, ya que permiten superar las concentraciones de equilibrio. También son más rápidas, pudiéndose realizar las síntesis en unas pocas horas en lugar de días (Van Rantwijk y col.(1999); Das-Bradoo y col.(2004))

A pesar de que las glicosidasas son estereoespecíficas e hidrolizan (y sintetizan) sólo enlaces α o β , no siempre son regioespecíficas y por lo tanto se pueden producir mezclas de productos. Cuántos, cuáles y en qué proporción se obtienen puede depender del origen de la enzima y la estructura del aceptor. Se ha reportado que la regioselectividad obtenida en las reacciones catalizadas por β -galactosidasas es altamente dependiente del átomo unido al carbono anomérico del azúcar aceptor. En general las glicosidasas producen preferentemente enlaces de tipo 1-6 durante la transglicosilación debido a la alta reactividad del hidroxilo primario del aceptor, sin embargo también se forman productos con otros tipos de unión (por ej.: 1-3 ó 1-4), pero sus velocidades de hidrólisis pueden ser rápidas en comparación con los

productos que presentan enlace 1-6 (Ichikawa y col (1992); Yoon y col. (1996); Palcic y col.(1999)).

1.2. Requisitos para la obtención de buenos rendimientos en la síntesis enzimática de glicósidos

A diferencia de las lipasas y las proteasas que pueden trabajar en solventes orgánicos anhidros, las glicosidasas no tienen esta capacidad. Por lo cual, cuando se utilizan estas enzimas en la síntesis de glicósidos la reacción de hidrólisis siempre está compitiendo. Varias estrategias se han utilizado para mejorar el rendimiento del glicósido de interés.

- i) El uso de glicósidos donadores muy reactivos, de forma tal que el mismo se hidrolice más rápido que el producto formado.
- ii) El uso de alta concentración de donador o aceptor.
- iii) Utilización de co-solventes orgánicos de forma de reducir la actividad de agua.

El producto de transglicosilación puede a su vez ser sustrato de la enzima y por lo tanto hidrolizado. Esta hidrólisis secundaria reduce el rendimiento del glicósido por lo cual es fundamental un control estricto de los tiempos de reacción. Está demostrado que altas concentraciones de co-solvente, grandes cantidades de enzima y cortos periodos de reacción son favorables para evitar la formación de productos secundarios (Van Rantwijk y col.(1999); Yoon y col.(1996).

Una de las mayores dificultades encontradas para trabajar con las enzimas en medios orgánicos es la baja estabilidad de las mismas en dicho medio de reacción. Por este motivo se han investigado diversas estrategias de estabilización de enzimas para su aplicación en solventes orgánicos.

1.3. Estrategias utilizadas para mejorar la estabilidad de los biocatalizadores en medios de reacción no convencionales.

El uso de solventes y co-solventes orgánicos puede mejorar notoriamente el comportamiento de muchas enzimas utilizadas para realizar biotransformaciones. Sin embargo la baja estabilidad de las mismas en estos medios de reacción no convencionales es la gran limitante para la implementación industrial de dichas biotransformaciones. Uno de los principales mecanismos responsables de la desnaturalización de una proteína en presencia de solventes orgánicos es la destrucción de la capa de hidratación que rodea a la misma (Khmelnitsky y col. (1991); Timasheff y col. (1993)). Por lo tanto, la reducción de la concentración de co-solvente en la cercanía inmediata de la molécula de enzima parece ser una propuesta racional para proteger a la proteína de este tipo de desnaturalización.

En este sentido se han reportado varias estrategias tales como: cristales de enzima entrecruzados (CLEC) (Häring y col. (1999)), agregados de enzima entrecruzados (CLEA) (Tyagi y col. (1999); Wilson y col. (2004)), micelas reversas (Marhuenda-Egea y col. (2002), atrapamiento de la molécula de proteína en matrices fuertemente hidrofílicas (Abian y col. (2001)). Sin embargo, la preparación de algunos de estos biocatalizadores es costosa, difícil de estandarizar y algunos de ellos muestran baja resistencia mecánica (Wilson y col. (2004)). Otros métodos que han sido reportados para mejorar la estabilidad en presencia de solventes orgánicos son los métodos moleculares (mutagénesis y evolución dirigida) (Dordick y col. (1992); O'Fagain y col. (2003)), la modificación química con compuestos hidrofílicos (Vinogradov y col. (2001); Spreti y col. (2004)), y la inmovilización en soportes sólidos (Ogino y col. (2001)).

1.3.1. Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas es una de las estrategias mas comúnmente usadas con el fin de mejorar la estabilidad de un biocatalizador frente a diferentes condiciones a las que pueda ser expuesto. Por definición la inmovilización de un biocatalizador implica la confinación o localización física de la enzima en una cierta región definida

del espacio con retención de sus propiedades catalíticas, y que el mismo pueda ser usado de manera repetida y continua (Katchalski-Katzir y col. (1993)). Dentro de las ventajas generales de utilizar un biocatalizador inmovilizado se encuentran la reutilización del mismo, la fácil separación y extracción de sustratos y productos del medio de reacción, generalmente mayor estabilidad, flexibilidad en el diseño de reactores, desarrollo de sistemas continuos, facilidad de control y automatización del proceso. Dentro de las desventajas están la pérdida o reducción de la actividad, limitaciones difusionales, y los costos adicionales.

Las proteínas pueden ser inmovilizadas en un soporte mediante una amplia variedad de interacciones que van desde adsorción física y uniones iónicas reversibles, hasta enlaces covalentes estables, lo cual a dado lugar al desarrollo de una gran diversidad de métodos de inmovilización que están ampliamente descritos en la bibliografía (Taylor (1991); Guisán y col. (1997a)).

En la Tabla 1 se detallan algunos de ellos y se los ha clasificado en dos grandes grupos: irreversibles y reversibles. El concepto de irreversibilidad significa que una vez que la enzima está unida al soporte, no puede ser liberada sin destruir su actividad biológica o destruir el soporte. Los procedimientos más comunes de inmovilización irreversible implican la formación de enlaces covalentes entre un grupo funcional de la enzima y un grupo químico específico del soporte; y también puede darse por confinamiento o atrapamiento de la enzima en una matriz sólida.

Por el contrario, las enzimas inmovilizadas de manera reversible a un soporte pueden ser eluidas del mismo en condiciones suaves de reacción. El uso de este tipo de métodos reversibles de inmovilización es muy atractivo desde el punto de vista económico, ya que el soporte puede ser regenerado y vuelto a cargar con enzima fresca.

Cuando el objetivo es la estabilización del biocatalizador en presencia de co-solventes orgánicos, la inmovilización covalente parece ser una buena estrategia ya que

generalmente el proceso de inactivación comienza con el desplegamiento de la proteína. La unión multipuntual de la enzima al soporte le confiere a la misma alta rigidez conformacional y en consecuencia la actividad enzimática puede retenerse en presencia de concentraciones significativas de solvente orgánico (Guisán y col. (1993)).

Tabla 1. Métodos de inmovilización de enzimas

Inmovilización	Métodos	Comentarios
Irreversible	Por formación de enlaces covalentes (por ej: amida, éter, tioéter, carbamato)	Grupos funcionales de la enzima involucrados - amino (Lys), tiol (Cys), - carboxilo (Asp, Glut)
	Por confinamiento	En geles como alginato, poliacrilamida, etc, y en fibras huecas de celulosa
Reversible	Adsorción (interacciones no covalentes)	Interacciones no específicas - Interacciones iónicas - Interacciones hidrofóbicas Interacciones por afinidad
	Quelación o interacciones con iones metálicos	Grupos funcionales de la enzima involucrados -imidazol (His)
	Unión covalente	Formación de enlaces disulfuro

1.3.2. Modificación del nano-ambiente que rodea al biocatalizador inmovilizado

La inmovilización de una enzima frecuentemente no es suficiente como estrategia única para alcanzar un alto grado de estabilización, sobre todo cuando se utiliza en presencia de solventes orgánicos. Por lo tanto se han diseñado estrategias complementarias para modificar el nano-ambiente que rodea al biocatalizador inmovilizado, de manera de protegerlo de los efectos perjudiciales del solvente

orgánico (Fernández-Lafuente y col. (1998); Abian y col. (2001); Guisán y col. (2001); Fernández-Lorente y col. (2001), Irazoqui y col. (2002 y 2007)). Esta estrategia combinada tiene como ventajas las propias de la inmovilización, más la protección que el ambiente hidrofílico le proporciona a la enzima frente a la presencia de co-solventes orgánicos.

2. Materiales y métodos

2.1. Ensayo de proteínas.

El contenido de proteínas para la enzima soluble y la inmovilizada fue estimado por el ensayo del ácido bicinconínico según lo descrito en Giacomini y col. (1998).

2.2. Actividad enzimática.

Fue ensayada utilizando el cromógeno ONPG como sustrato, según lo descrito por Irazoqui y col (2007). Una unidad de enzima (UE) fue definida como la cantidad de enzima que hidroliza un μmol de ONPG a ONP y galactosa en un minuto a temperatura ambiente y pH 5.5.

2.3. Inmovilización de β -galactosidasa en tiolsulfonato-agarosa.

El soporte tiolsulfonato (TSI) -agarosa fue preparado según lo descrito por Batista-Viera y col (1994). El tratamiento de tiolación de la enzima se realizó según lo previamente reportado por Carlsson y col. (1978) con algunas modificaciones (Giacomini y col. (2007). Una alícuota de 1 gramo de gel escurrido conteniendo 20 μmoles de grupos TSI fue incubada con 10 ml de una solución de β -galactosidasa tiolada de *A. oryzae* (2 mg/ml, 20 EU/ml) en fosfato de sodio 50mM pH 7.0, durante 24 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Los grupos TSI reactivos

remanentes fueron bloqueados con una solución de glutatión reducido. El derivado obtenido se denominó TSI20.

2.4. Inmovilización de β -galactosidasa en glutaraldehído-agarosa.

El soporte glutaraldehído-agarosa se sintetizó según lo descrito por Guisán y col. (1997a). La inmovilización de la enzima en dicho soporte se realizó según lo descrito por Irazoqui y col. (2007). Una alícuota de 1 gramo de gel escurrido conteniendo 90 μ moles de grupos glutaraldehído fue incubada con 10 ml de una solución de β -galactosidasa de *A. oryzae* (2 mg/ml, 94 EU/ml) en fosfato de sodio 50mM pH 7.0, durante 24 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Al cabo de este tiempo el gel fue filtrado a través de una placa filtrante de vidrio y equilibrado con carbonato de sodio 20 mM pH 10.0. El derivado fue suspendido en una solución 26.4 mM de borohidruro de sodio en buffer carbonato de sodio 20 mM pH 10.0, en una relación de 1 g de gel escurrido : 14 ml de volumen total. La suspensión fue incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave, y después lavada con acetato de sodio 50mM pH 5.5 (buffer de actividad) y almacenada a 4° C. Este derivado enzimático fue denominado Glut90.

2.5. Modificación de la enzima inmovilizada con polímeros de dextrano modificados.

El polialdehído-dextrano y la poliamina-dextrano se prepararon según lo descrito por Guisán y col. (1997b). La modificación de la enzima inmovilizada se realizó según lo descrito por Irazoqui y col (2007). En la primera etapa de la estrategia de hidrofiliación se hizo reaccionar una alícuota de derivado Glut90 con polialdehído-dextrano, de manera que los grupos aldehídos del polímero reaccionaran con los grupos amino de la superficie de la enzima formándose una base de Schiff que es posteriormente reducida a un enlace alquil-amino estable. El derivado obtenido se

denominó Glut90-Pal. La segunda etapa de la hidrofiliación consistió en el agregado de poliamina-dextrano al derivado Glut90-Pal sin reducir, de manera de que los grupos amino del polímero reaccionaran con los grupos aldehídos de la capa de polímero anterior, este nuevo derivado se denominó Glut90-Pal-Pam.

2.6. Estabilidad en presencia de acetona.

Alícuotas de una suspensión de derivado en buffer de actividad conteniendo 25 UE/ml, fueron incubadas con distintas concentraciones de acetona a 30 °C. Cada cierto tiempo se tomaron muestras para determinar la actividad enzimática y representar la actividad enzimática residual frente al tiempo de exposición al solvente.

2.7. Síntesis enzimática de galactósidos

2.7.1. Síntesis de galactosil-xilosa

A 10 ml de una solución de ONPG 50 mM conteniendo 0.5 M xilosa en buffer acetato de sodio 50 mM pH 5.5, se le agregaron 10 UE de β -galactosidasa de *A. oryzae* soluble o inmovilizada sobre geles glutaraldehído-agarosa (concentración final de enzima 1 UE/ml). La mezcla se incubó durante tres horas a temperatura ambiente y se tomaron alícuotas a tiempos regulares. La reacción enzimática se detuvo por calentamiento a 100 °C durante 5 minutos en el caso de la enzima soluble y por filtración en el caso del derivado enzimático. El avance de la reacción se siguió por HPLC.

La síntesis de galactosil-xilosa se llevó a cabo en las mismas condiciones pero en presencia de distintas concentraciones de acetona.

2.7.2. Síntesis de galactosil-etilenglicol

A 10 ml de una solución de dador de grupo galactosilo (ONPG 50 mM o Lactosa 69 mM) en buffer acetato de sodio 50 mM pH 5.5 conteniendo 8.9 M de etilenglicol, se le agregaron 10 UE de β -galactosidasa soluble o inmovilizada sobre geles glutaraldehído agarosa cuando el dador era ONPG, y 60 UE cuando el dador era lactosa (concentración final de enzima 1 y 6 UE/ml respectivamente). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante dos horas cuando el dador era ONPG y durante 72 horas cuando el dador era lactosa y se sacaron alícuotas a tiempos regulares.

La reacción enzimática se detuvo por calentamiento a 100 °C durante 5 minutos en el caso de la enzima soluble y por filtración en el caso del derivado enzimático. El avance de la reacción se siguió por HPLC.

3. Resultados y Discusión

3.1. Inmovilización covalente de β -galactosidasa de *A. oryzae*.

Con el objetivo de obtener un derivado inmovilizado de β -galactosidasa de *A. oryzae* fueron utilizadas dos estrategias diferentes de unión a geles de agarosa. Una de ellas se basa en la reacción de los grupos amino de la proteína con grupos glutaraldehído unidos al soporte, siendo este un método tradicional y efectivo para la inmovilización y estabilización de enzimas. La segunda estrategia utilizada presenta un aspecto muy interesante y es que la unión se da a través de la formación de un enlace covalente de tipo disulfuro entre los grupos sulfhídrido expuestos de la enzima y los grupos tiolsulfonato unidos a la matriz. Esto permite que el mismo pueda ser escindido con agentes reductores como el DTT, posibilitando la elución de la enzima cuando su actividad decae, la regeneración de los grupos reactivos del soporte y la recarga del mismo con enzima fresca. La β -galactosidasa de *A. oryzae* tiene 4 residuos de cisteína en su estructura (NCBI, <http://ncbi.nlm.nih.gov>) pero ninguno de ellos puede

ser titulado, poniendo en evidencia que los mismos no se encuentran expuestos e imposibilitando por lo tanto la unión a soportes tiol- reactivos. Se utilizó entonces una estrategia por modificación química (tiolación de grupos amino superficiales) para generar de esta forma 2.8 moles de grupos SH/mol de proteína.

Tabla 2. Rendimientos de inmovilización de la β -galactosidasa de *A. oryzae*

Derivado Inmovilizado	Proteína unida al gel		Actividad unida al gel		k_M para ONPG (mM)
	mg/g gel	% ^a	UE/g gel	% ^b	
TSI20	10.0	77	382	52	8.0
Glut90	12.2	54	357	38	6.3
Glut90-Pal	12.2	54	289	31	12
Glut90-Pal-Pam	12.2	54	207	22	15

^a Cantidad de proteína inmovilizada expresada como porcentaje de la cantidad de proteína aplicada (rendimiento de inmovilización en proteínas).

^b Cantidad de actividad inmovilizada expresada como porcentaje de la cantidad de actividad aplicada (rendimiento de inmovilización en actividad).

^c k_M de la enzima soluble usando ONPG como sustrato =2.5 mM

El rendimiento de inmovilización en actividad en TSI-agarosa conteniendo 20 μ moles de grupos reactivos /g de gel escurrido, fue mayor que el obtenido en la inmovilización en glutaraldehído-agarosa conteniendo 90 μ moles de grupos reactivos /g de gel escurrido, 52 y 38% respectivamente (Tabla 2). Esto indica que las moléculas de enzima inmovilizada retienen en mayor proporción su conformación activa con la química del tiolsulfonato. Una explicación posible es que las condiciones usadas en el proceso de inmovilización en tiolsulfonato-agarosa son más suaves que las usadas con el soporte glutaraldehído-agarosa, ya que este último tiene una etapa de reducción con borohidruro de sodio, a pH 10.0 durante 30 minutos, lo que posiblemente inactiva parte de la proteína inmovilizada. En el caso de los derivados inmovilizados en glutaraldehído-agarosa el tratamiento de hidrofiliación produjo un efecto de

inactivación menor, comparado con el fuerte efecto inactivante producido por el proceso de inmovilización en estos geles.

La inmovilización en Glut90- agarosa y en TSI 20-agarosa de la enzima de *A. oryzae* produjo un aumento en el valor de K_M aparente de 2.5 mM (enzima soluble) a 6.3 mM y 8.0 mM, respectivamente, usando ONPG como sustrato. Es un hecho bien conocido que el proceso de inmovilización de una enzima a un soporte sólido afecta los parámetros cinéticos de la misma. Además, las representaciones gráficas del “*direct linear plot*” de los derivados inmovilizados mostraron una gran complejidad, lo que es indicativo de la existencia de problemas difusionales (Peter, 1981). Esto puede ser reflejo de cambios conformacionales que afectan la afinidad de la enzima hacia el sustrato, y/o la existencia de restricciones difusionales debidas a la inmovilización. La primera capa de hidrofiliación (Glut 90-Pal) produjo un aumento adicional en la K_M , pero sorprendentemente, no hubo una gran diferencia entre los valores de K_M de ambos derivados hidrofiliados.

El tratamiento de hidrofiliación no puede aplicarse a derivados enzimáticos inmovilizados en TSI-agarosa, debido a que en la etapa de reducción de las bases de Schiff generadas entre los polímeros hidrofílicos y la enzima, necesaria para obtener un enlace estable, se produciría también la reducción del enlace disulfuro, eluyendo así la proteína unida a la matriz.

3.2. Estabilidad de los derivados inmovilizados en presencia de acetona como co-solvente

Para caracterizar el comportamiento de los derivados en presencia de co-solventes orgánicos se estudió la estabilidad de los mismos en acetona. Los resultados experimentales de actividad residual frente al tiempo fueron analizados de acuerdo al modelo de inactivación en dos pasos propuesto por Henley y col. (1984) y ajustados a

una caída exponencial simple o doble, con o sin alfa (con ayuda del programa Enzfitter); se calcularon las constantes de decaimiento k_1 , k_2 , α_1 y la vida media.

La primera fase de hidrofiliación del derivado Glut90 permitió alcanzar un alto grado de estabilización en presencia de 36% v/v de acetona (aumento de la vida media en un factor de 13 respecto al derivado Glut90 sin hidrofiliar y un factor de 19 frente al derivado TSI20); sin embargo cuando la concentración de co-solvente aumentó a 50% v/v, la estabilidad del derivado Glut 90- Pal no mostró ninguna mejora (Tabla 3). Esto estaría indicando que la capa hidrofílica que rodea a la molécula de enzima, no es suficiente protección contra la alta concentración de acetona, demostrando que se requiere un efecto estabilizante adicional para trabajar en estas condiciones drásticas. Se aplicó entonces la segunda capa de hidrofiliación al derivado β -galactosidasa-Glut90-Pal con poliamina-dextrano. El derivado hiper-hidrofiliado obtenido (Glut90-Pal-Pam) mostró un efecto estabilizante significativamente positivo, dado que presentó una vida media 25 veces mayor que el derivado Glut90 sin modificar (Tabla 3). Además dicho derivado Glut90-Pal-Pam fue testado bajo condiciones muy exigentes (acetona 75% v/v) obteniéndose resultados extremadamente positivos: el derivado hiper-hidrofiliado retuvo el 40% de su actividad original luego de 24 horas de incubación, en

Tabla 3. Estabilidad de los diferentes derivados enzimáticos en acetona 50% v/v.

	$k_1(h^{-1})$	$k_2(h^{-1})$	Alfa 1	$t_{1/2}$ (h)
Glut90	3.1×10^{-1}	2.5×10^{-2}	29.0	5.0
Glut90-Pal	9.7×10^{-2}	-	-	7.2
Glut90-Pal-Pam	1.9×10^{-1}	2.9×10^{-3}	70.0	123.0
TSI20	1.2×10^{-1}	5.0×10^{-3}	1.7	5.8
Enzima soluble	3.7×10^{-2}	7.9×10^{-3}	29.0	30.2

comparación con un 0.2 % de actividad residual del derivado Glut90 para el mismo tiempo de incubación.

Se realizaron ensayos de inactivación térmica a 60°C de todos los derivados y los resultados mostraron que la estrategia de hidrofiliación no produce ninguna estabilización adicional; sugiriendo que el posible entrecruzamiento de la enzima con los polímeros tiene un mínimo efecto sobre la rigidez de la misma. Si la rigidez hubiera sido incrementada debería observarse un aumento paralelo en la estabilidad térmica. Por lo tanto, la hidrofiliación parece ser especialmente efectiva en prevenir el desplegamiento del corazón hidrofóbico de la enzima, lo que ocurre cuando una proteína es expuesta a un medio con baja polaridad como es la presencia de co-solventes orgánicos.

3.3. Síntesis enzimática de galactósidos utilizando derivados inmovilizados de β -galactosidasa de *A. oryzae*.

Las β -galactosidasas son glicosidasas capaces de catalizar reacciones de transglicosilación, en particular la proveniente de *Aspergillus oryzae*, que además es muy estable térmicamente y frente a la presencia de co-solventes (Irazoqui y col. (2007), Reuter y col (1999)). Ya que el comportamiento de los derivados inmovilizados (Glut90 y TSI20) en cuanto a actividad expresada en el gel y estabilidad en acetona fue bastante similar, se eligió el procedimiento de inmovilización del glutaraldehído porque la enzima no necesita tratamiento previo, a diferencia de lo que sucede en la inmovilización en TSI-agarosa, donde es necesaria la tiolación de la misma. Por lo tanto se utilizó la enzima inmovilizada en glutaraldehído-agarosa para la síntesis de dos galactósidos

La síntesis de galactosil xilosa se llevó a cabo utilizando la enzima inmovilizada y una concentración de aceptor de 0.5M, la cual fue optimizada previamente (Giacomini y

col. (2002)). En medio acuoso el rendimiento de síntesis fue de un 28% y el porcentaje de conversión de ONPG fue de un 79 % (Tabla 4). Estos resultados reflejan el hecho de que la reacción de hidrólisis está compitiendo con los procesos de transglicosilación, lo cual es frecuente.

El uso de co-solventes orgánicos disminuye la actividad del agua lo que favorecería la reacción de transglicosilación frente a la hidrólisis. Se estudió entonces, la síntesis de galactosil-xilosa en presencia de distintas concentraciones de acetona, solvente en el cual la enzima demuestra cierto nivel de estabilidad. Sin embargo en la Tabla 4 se puede observar que, contrariamente a lo esperado, los rendimientos de síntesis disminuyen respecto a los obtenidos en medio acuoso, al igual que los porcentajes de conversión de ONPG, a pesar de trabajar a tiempos más largos. Esto estaría indicando que en presencia de este co-solvente la enzima ve dificultado su funcionamiento. De estos resultados se puede concluir que si bien los co-solventes disminuyen la actividad del agua, para el caso de esta glicosidasa también pueden disminuir la actividad catalítica de la enzima por lo cual no siempre es posible aumentar los rendimientos de síntesis mediante la utilización de co-solventes orgánicos.

Tabla 4. Síntesis de galactosil-xilosa con la enzima inmovilizada

Co- solvente	Tiempo al que se alcanza el máximo rendimiento de síntesis (min)	Rendimiento de síntesis (%) ¹	Grado de conversión de ONPG (%)
Ninguno	60	28	79
10% Acetona	120	19	54
25% Acetona	120	19	64

¹ El rendimiento de síntesis se expresa como porcentaje del producto obtenido respecto del dador

Los rendimientos de síntesis de galactosil-etilenglicol cuando se utiliza ONPG como dador de grupo galactosilo son muy superiores a los obtenidos para la síntesis de

galactosil-xilosa (Tabla 5). Probablemente esto se deba a dos motivos. Por un lado el etilenglicol cumple la doble función de aceptor y co-solvente orgánico y por otro la concentración utilizada es casi 18 veces mayor que la de xilosa. El etilenglicol, a diferencia de la xilosa, se puede utilizar en tan altas concentraciones porque no existen problemas de solubilidad ni de incremento de la viscosidad del medio. La presencia de etilenglicol enlentece la cinética de conversión del ONPG, ya que son necesarias 4 horas de incubación para alcanzar un 70% de conversión, pero permite obtener altos rendimientos de síntesis (70%, Tabla 5). Por otra parte a lo largo del proceso de síntesis no se observa la liberación de galactosa. Esto significa que toda la galactosa proveniente de la lactosa es transferida al etilenglicol y que por lo tanto no hay competencia de la reacción de hidrólisis. Esto queda de manifiesto por el hecho que los porcentajes de síntesis y de conversión son iguales. Todo lo mencionado anteriormente convierte al etilenglicol en un excelente aceptor.

Tabla 5. Síntesis de galactosil-etilenglicol con enzima soluble e inmovilizada.

Enzima	Donador	Aceptor	Tiempo de reacción	% Síntesis ¹	% Conversión del donador
Soluble	ONPG (50 mM)	Etilenglicol 8.9M	4 h	70%	70%
Soluble	Lactosa (69 mM)	Etilenglicol 8.9 M	24 h	77%	77%
Inmovilizada	Lactosa (69 mM)	Etilenglicol 8.9M	24 h	58%	71%

¹ El rendimiento de síntesis se expresa como porcentaje del producto obtenido respecto del dador

Los resultados de la Tabla 5 muestran que el ONPG es mucho mejor dador de grupo galactosilo que la lactosa ya que se obtienen los mismos % de síntesis en un tiempo 6

veces menor. Sin embargo la lactosa es mucho más económica, puede obtenerse a partir de un producto de deshecho (lactosueros y permeados) y permite alcanzar buenos rendimientos aunque en tiempos mayores.

Con respecto al uso de la enzima inmovilizada, se alcanzan rendimientos similares a los de la enzima soluble pero ofrece como ventaja el poder detener la reacción enzimática en un simple paso de filtración y el poder reutilizar la enzima.

4. Conclusiones y perspectivas de futuro

Los resultados alcanzados en este trabajo muestran que las propiedades de los biocatalizadores inmovilizados dependen del procedimiento utilizado para su inmovilización; y que es posible modificar alguna de estas propiedades utilizando una estrategia de hidrofiliación del nanoambiente que rodea a la enzima.

Uno de estos derivados fue utilizado en la biotransformación de la lactosa, obteniéndose muy buenos resultados que ponen de manifiesto la viabilidad del uso de glicosidasas en la síntesis de galactósidos, como una buena alternativa a la síntesis química. A su vez se demostró la factibilidad del uso de lactosa como dador de grupo galactosilo. Esto permitiría un mejor aprovechamiento del lactosuero, un producto de deshecho de la industria láctea para la obtención de galactósidos de alto valor añadido. Se logró la síntesis de dos galactósidos: galactosil-xilosa donde los mejores rendimientos se alcanzaron en medio acuoso, y galactosil-etilenglicol. En este último caso los excelentes rendimientos obtenidos hacen que resulte interesante el estudio de otros aceptores, en particular alcoholes para la síntesis de nuevos galactósidos.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo recibido del CYTED (Proyecto A.1.2.) y del PEDECIBA-Química.

Referencias

- Abian, O., Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Palomo, J.M., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. (2001). Stabilization of immobilized enzymes against water-soluble organic co-solvents and generation of hyper-hydrophilic micro-environments surrounding enzyme molecules. *Biocatal. Biotransformation*, 19, 489-503.
- Batista-Viera, F., Manta, C., Carlsson, J. (1994). Solid-phase thiolsulphinates for the reversible immobilization of thiols. *Appl Biochem Biotechnol.*, 44, 1-14.
- Bucke C. (1996). Oligosaccharide synthesis using glycosidases. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 67: 217-220.
- Carlsson, J., Drevin, H., Axén, R. (1978). Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. *Biochem. J.*, 173, 723-737.
- Colombo, D., Compostella, F., Ronchetti, F., Scala, A., Toma, L., Kuchide, M., Tokuda, H., Nishino, H. (2000). Antitumor-promoting effects of glycolipid analogues on two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Lett.* 161, 201-205.
- Colombo, D., Scala, A., Talno, I.M., Toma, L., Ronchetti, F.(1996). 1-O-, 2-O- and 3-O- β -glycosyl-sn-glycerols: Structure-antitumor-promoting activity relationship, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6, N° 10, 1187-1190.
- Crout, D.H.G., MacManus, D.A. (1990). Enzymatic synthesis of glycosides using the beta-galactosidase of E.coli: regio- and stereo-chemical studies. *J.Chem.Soc.Perkin Trans 1*, 1865-1868.
- Das-Bradoo, S., Svensson, I., Santos, J., Plieva, F., Mattiasson, B., Hatti-Kaul, R. (2004) Synthesis of alkyl-galactosides using whole cells of *Bacillus pseudofirmus* species as catalysts. *J. Biotechnol.* 110: 273-285.
- Dordick, J.S.(1992). Designing enzymes for use in organic solvents. *Biotechnol. Prog.*, 8, 259-267.
- Ducret, A., Trani, M., Lortie, R. (2002). Screening of various glycosidases for the synthesis of octyl-glucoside. *Biotechnol. Bioeng.* 77 (7), 752-757.
- Fernández-Lafuente, R., Rosell, C.M., Caanan-Haden, L., Rodes, L. and Guisán, J.M. (1998). Stabilization of immobilized enzymes against organic solvents: complete hydrophilization of enzyme environments by solid-phase chemistry with poly-functional macromolecules. In A. Ballesteros, F.J. Plou, J.L. Iborra & P.J. Halling, *Progress in Biotechnology. Stability and stabilization of Biocatalysts*. (Vol. 15)(pp. 405 – 410). Amsterdam: Elsevier.
- Fernández-Lorente, G., Fernández-Lafuente, R., Armisen, P., Sabuquillo, P., Mateo, C. and Guisán, J.M. (2000). Engineering of enzyme via immobilization and post-

- immobilization techniques: preparations of enzymes derivatives with improved stability in organic media, In M.N. Gupta, *Methods in Non-aqueous Enzymology Series: Methods and Tools in Biosciences and Medicine* (pp. 36-51). Basel: Birkhauser.
- Giacomini, C., Villarino, A., Franco-Fraguas, L. and Batista-Viera, F.(1998). Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, 4, 313-327.
- Giacomini, C., Irazoqui, G., González, P., Batista-Viera, F., Brena, B.M. (2002). Enzymatic synthesis of galactosyl-xylose by *A.oryzae* β -galactosidase. *J.Mol.Catal.B Enzym.*,19-20,159-165.
- Giacomini, C., Irazoqui, G., Batista-Viera, F., Brena, B.M. (2007). Chemical thiolation strategy: A determining factor in the properties of thiol-bound biocatalysts. *Biocatal. Biotransformation*, 25(5), 373-381.
- Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R., Rodríguez, V., Bastida, A., Alvaro G. (1993). Enzyme stabilization by multipoint covalent attachment to activated pre-existing supports. In W. Van den Tweel, A.Harder, R.Buitelaar, *Stability and stabilization of enzymes* (pp.55-62).Amsterdam: Elsevier.
- Guisán, J.M., Penzol, G., Armisen, P., Bastida, A., Blanco, R.M., Fernández-Lafuente, R., García-Junceda, E. (1997a). Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrates. In G.F. Bickerstaff, *Immobilization of Enzymes and Cells* (pp. 261-275). New Jersey: Human Press Inc.
- Guisán, J.M., Rodríguez, V., Rosell, C.M., Soler, G., Bastida, A., Blanco, R.M., Fernández-Lafuente, R., García-Junceda, E. (1997b). Stabilization of immobilized enzymes by chemical modification with polyfunctional macromolecules. In G.F. Bickerstaff, *Immobilization of Enzymes and Cells* (pp. 289-298). New Jersey: Human Press Inc.
- Guisán, J.M., Sabuquillo, P., Fernández-Lafuente, R., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Halling, J.P., Kennedy, D., Miyata, E., Re, D. (2001). Preparation of new lipases derivatives with high activity-stability in anhydrous media: adsorption on hydrophobic supports plus hydrophilization with polyethyleneimine. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, 11, 817-824.
- Hara Y., Suyama K. (2000). Biosynthesis of β -1,1- and β 1, β 1-galactopyranosyl-xylopyranosides in the mammary gland of lactating cow. *Eur. J. Biochem.* 267, 830-836.

- Häring, D., Schreier, P. (1999). Cross-linked enzyme crystals. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3, 35-38.
- Henley, J.P., Sadana, A. (1984). A mathematical analysis of enzyme stabilization by a series-type mechanism: Influence of chemical modifiers. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 959-969.
- Ichikawa, Y., Look, G.C., Wong, C.H. (1992). Enzyme-catalyzed oligosaccharide synthesis. *Anal. Biochem.*, 202: 215-238.
- Irazoqui, G., Villarino, A., Batista-Viera, F. and Brena, B.M. (2002). Generating favorable nano-environments for thermal and solvent stabilization of immobilized beta-galactosidase. *Biotechnol. Bioeng.*, 77, 4, 430-434.
- Irazoqui, G., Giacomini, C., Batista-Viera F. and Brena, B.M. (2007) Hydrophilization of immobilized model enzymes suggests a widely applicable method for enhancing protein stability in polar organic co-solvents. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, 46, 43-51
- Katchalski-Katzir E. (1993). Immobilized enzymes--learning from past successes and failures. *Trends Biotechnol.*, 11: 471- 478.
- Khmelnitsky, Y.L., Belova, A.B., Levashov, A.V., Mozhaev, V.V. (1991). Relationship between surface hydrophilicity of a protein and its stability against denaturation by organic solvents. *FEBS Lett.*, 284, 267-269.
- Klewicki, R., Klewicka, E. (2004). Antagonistic activity of lactic acid bacteria as probiotics against selected bacteria of the Enterobacteriaceae family in the presence of polyols and their galactosyl derivatives. *Biotechnol. Lett.*, 26, 317-320.
- Marhuenda-Egea, F.C., Piera-Velazquez, S., Cadenas, C., Cadenas, E. (2002). Reverse micelles in organic solvents: a medium for the biotechnological use of extreme halophilic enzymes at low salt concentration. *Archaea*, 1, 105-11.
- Maugard, T., Gaunt, D., Legoy, M.D., Besson, T. (2003). Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol. Lett.* 25: 623-629.
- Miller, J. N., Whistler, R. L. (2000). Carbohydrates. In O. Fennema. *Food chemistry* (p. 207). New York: Marcel Dekker
- O'Fagain, C. (2003). Enzyme stabilization-recent experimental progress. *Enzyme Microb. Technol.*, 33: 137-149.
- Ogino, H. and Ishikawa, H. (2001). Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. *J. Biosci. Bioeng.*, 91, 2: 109-116.
- Palcic, M.C. (1999). Biocatalytic synthesis of oligosaccharides. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10: 616-624.

- Rabinovich, G.A., Cumashi, A., Bianco, G.A., Ciavardelli, D., Lurisci, I., D'Egidio, M., Piccolo, E., Tinari, N., Nifantiev, N., Iacobelli, S. (2006), Synthetic lactulose amines: novel class of anticancer agents that induce tumor-cell apoptosis and inhibit galectin-mediated homotypic cell aggregation and endothelial cell morphogenesis. *Glycobiology*. 16(3), 210-220.
- Rastall, R.A., Maitin, V. (2002). Prebiotics and symbiotic: towards the next generation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13: 490-496.
- Reuter, S., Nygaard, A.R., Zimmermann, W. (1999). β -Galactooligosaccharide synthesis with β -galactosidases from *Sulfolobus solfataricus*, *Aspergillus oryzae*, and *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.*, 25, 509-516.
- Rycroft, C.E., Jones, M.R., Gibson, G.R., Rastall, R.A.(2001). A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides, *J. Appl. Microb.*, 91: 878-887.
- Sanz, M.L., Gibson G.R., Rastall, R.A. (2005). Influence of disaccharide structure on prebiotic selectivity in vitro, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 5192-5199.
- Spreti, N., Germani, R., Icani, A., Savelli, G. (2004). Stabilization of chloroperoxidase by polyethylene glycols in aqueous media: kinetics studies and synthetic applications. *Biotechnol. Prog.*, 20, 96-101.
- Taylor, R.F. (1991). *Protein immobilization. Fundamentals and applications*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Tejler, J., Leffler, H., Nilsson, U.J. (2005). Synthesis of O-galactosyl aldoximes as potent LacNac-mimetic galectin 3 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 2343-2345.
- Timasheff, S. (1993). The control of protein stability and association by weak interactions with water: How do solvents affect these processes? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 22, 67-97.
- Tyagi, R., Batra, R., Gupta, M.N. (1999). Amorphous enzyme aggregates: stability toward heat and aqueous-organic co-solvent mixtures. *Enzyme Microb. Technol.*, 24, 348-354.
- Van Rantwijk, F., Woudenberg-van Oosterom, M., Sheldon, R.A. (1999). Glycosidase-catalyzed synthesis of alkyl glycosides. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, 6, 511-532.
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J. (1999). Glycobiology in Biotechnology and Medicine. In: *Essentials of Glycobiology*. (pp.625- 634). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Vinogradov, A.A., Kudryashova, E.V., Grinberg, V.Y., Grinberg, N.V., Burova, T.V., Levashov, A.V. (2001). The chemical modification of alpha-chymotrypsin with both hydrophobic and hydrophilic compounds stabilizes the enzyme against denaturation in water-organic media. *Protein Eng.*, 14, 683-689.
- Wilson, L., Illanes, A., Pessela B.C., Abian, O., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. (2004). Encapsulation of cross linked Penicillin G Acylase aggregates in Lentikats: evaluation of a novel biocatalyst in organic media. *Biotechnol. Bioeng.*, 86, 558-562.
- Yoon, J.H., Ajisaka, K. (1996). The synthesis of galactopyranosyl derivatives with β -galactosidases of different origins. *Carbohydr. Res.*, 292: 153-163.

Estudio reológico de sistemas elaborados con proteínas del suero tratadas térmicamente y congeladas.

B. E. Meza¹, R. A. Verdini^{1,2} y A. C. Rubiolo^{1*}

¹*Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (UNL - CONICET), Güemes 3450, 3000, Santa Fe, Argentina.* ²*Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR), Suipacha 531, 2000,*

Rosario, Argentina.

**Tel: +54-342-4559175, Fax: +54-342-4550944,*

e-mail: arubiolo@intec.unl.edu.ar

1. Presentaciones de las proteínas del suero en el mercado

Los productos en polvo a base de proteínas del suero de quesería se comercializan comúnmente como aislados (WPI) y concentrados (WPC). Estos productos difieren tanto en la materia prima de origen como en el proceso de elaboración y consecuentemente en su composición (McDonough y col., 1974; Morr, 1985; de Wit y col., 1986; Morr y Foegeding, 1990; Huffman, 1996). Los WPC tienen porcentajes de proteína que varían entre 30% y 85%, mientras que los WPI tienen contenidos de proteína mayores al 90%. La mayoría de las empresas lácteas argentinas que se dedican a la concentración y secado de proteínas del suero realizan el proceso ya sea utilizando la capacidad de las plantas productoras de leche en polvo o empleando plantas exclusivamente diseñadas para el procesamiento del suero. Se estima que en Argentina existen aproximadamente 12 importantes plantas procesadoras de suero de quesería, la mayor parte localizadas en la zona pampeana. Las dos firmas más importantes por su capacidad de procesamiento son AFISA SA (una empresa conjunta de Arla Food Ingredients SA y Sancor Cooperativas Unidas Limitada), con una planta ubicada en Córdoba; y Remotti SA, con plantas en Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires. Otras empresas dedicadas al procesamiento del suero son Mastellone Hnos. SA., Milkaut SA, García Hnos. Agroindustrial SRL, Sobrero y

Cagnolo SA., Cotapa (Cooperativa Láctea Paraná), Arcolen Argentina SA, Sucesores de Alfredo Williner SA, Saputo Inc. y Lácteos Conosur SA (Schaller, 2009).

Argentina se encuentra entre los principales países productores y exportadores de proteínas del suero en polvo. Los productos más comercializados en el mercado interno son los WPC que poseen un contenido de proteína entre 35% y 40%. Las estadísticas oficiales muestran un crecimiento importante en el último tiempo, donde la producción nacional se duplicó entre 2004 y 2007. Entre 1999 y 2008, las exportaciones se multiplicaron por once, hasta alcanzar un récord del orden de las 36.000 ton/año en 2008 (Schaller, 2009).

Las proteínas del suero pueden utilizarse como ingrediente en la elaboración de productos alimenticios para incrementar su valor nutricional y/o para obtener propiedades funcionales deseadas (gelificación, espesamiento, espumado, etc.). Se han descripto diversas metodologías para la inclusión de proteínas del suero durante el proceso de elaboración de quesos que permiten mejorar el rendimiento y el valor nutricional de estos productos (Sanchez y col., 1996; Santoro y Faccia, 1996; Lo y Bastian, 1998; Hinrichs, 2001). En estos trabajos, se informó que las proteínas del suero debían presentar un cierto grado de desnaturalización y/o agregación para que puedan interaccionar con las caseínas y queden retenidas en la matriz del queso.

El tratamiento térmico de las suspensiones de proteínas del suero por encima de cierta temperatura produce, en primera medida, la apertura de la estructura terciaria de las moléculas de proteína, permitiendo la exposición de sitios activos de naturaleza hidrofóbica. Este fenómeno permite que las mismas interaccionen entre sí para formar agregados que, en concentraciones por debajo de la crítica necesaria para formar un gel, pueden permanecer en solución aumentando la viscosidad de la misma (Vardhanabhuti y Foegeding, 1999; Mleko y Foegeding, 1999). Las proteínas desnaturalizadas y los agregados proteicos son capaces de interaccionar de manera más efectiva con los demás ingredientes que conforman los alimentos, debido a que

poseen más cantidad de sitios activos expuestos que presentan una mayor reactividad. De esta manera, los tratamientos térmicos realizados en condiciones controladas de temperatura, tiempo y concentración total de proteína pueden provocar la desnaturalización y/o agregación de las proteínas sin producir gelificación, modificando así las propiedades funcionales y reológicas de las suspensiones que las contienen.

Algunos productos elaborados a base de proteínas de suero fueron diseñados con objetivos especiales. De esta forma, se desarrolló un concentrado de proteínas del suero que posee la característica de imitar algunas propiedades funcionales propias de las grasas en los alimentos a los cuales son adicionados. Este producto se encuentra patentado con el nombre de Simplese®. El mismo se elabora a partir de concentrados con contenidos de proteína entre 35% y 54%, en donde las proteínas del suero son desnaturalizadas por calor a temperaturas entre 90 y 120 °C durante tiempos que pueden variar entre 5 min a 4 s. Luego, el concentrado es sometido a un proceso mecánico de microparticulación que consiste en la aplicación de tensiones de corte utilizando intercambiadores de calor de placas (5000 a 40000 s⁻¹) u homogeneizadores de alta presión (750 a 1000 bars). De este modo, se obtienen micropartículas esféricas uniformes de un diámetro medio de 1 µm y se evita la formación de agregados proteicos de mayor tamaño (Singer y col., 1988, Singer, 1996).

La importancia de estos aditivos imitadores de grasa radica en que la disminución del contenido lipídico causa defectos texturales, funcionales y sensoriales en los quesos magros debido a que la grasa aporta suavidad a la textura y contribuye al *flavor* de los quesos tradicionales. En los quesos magros las caseínas juegan el rol más importante en el desarrollo de la textura y por este motivo, los mismos suelen presentar una estructura más firme y gomosa en comparación con la de un queso

tradicional (Mistry, 2001). De esta forma, el uso de aditivos imitadores de grasa en el proceso de elaboración de quesos magros es una estrategia útil para mejorar su textura (Rodríguez, 1998; Mistry, 2001; Banks, 2004).

Por lo tanto, el conocimiento de las propiedades mecánicas y texturales de los sistemas alimentarios elaborados con proteínas del suero es de particular interés para los tecnólogos alimentarios.

2. Caracterización reológica de sistemas que contienen proteínas del suero

El estudio del comportamiento reológico de los alimentos y de sus ingredientes es utilizado en el campo del control de calidad, procesamiento y manipulación de los mismos. Los ensayos oscilatorios se llevan a cabo aplicando una deformación o tensión sinusoidal controlada y midiendo la correspondiente tensión o deformación experimentada por el material. Estos ensayos efectuados dentro de la zona de respuesta lineal tienen especial aplicación, ya que permiten evaluar por separado la influencia que tiene el comportamiento sólido y fluido de un alimento viscoelástico. Dentro de los modelos reológicos existentes, el modelo de Ley de Potencia permite obtener parámetros que pueden utilizarse para analizar la dependencia de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') con la frecuencia de medición.

2.1. Comportamiento reológico de suspensiones de proteína del suero

Las propiedades reológicas de los polímeros y de los agregados está relacionada con el tamaño y la forma de las moléculas (Vardhanabhuti y Foegeding, 1999). Debido a que las proteínas del suero en estado nativo son relativamente pequeñas y presentan una conformación compacta y organizada, las soluciones que las contienen presentan baja viscosidad. Por otro lado, las proteínas del suero en estado desnaturalizado poseen una conformación más aleatoria y desordenada y los agregados que se forman a partir de ellas poseen una forma más asimétrica, un

tamaño y una fracción volumétrica efectiva mayor que la de las proteínas del suero en estado nativo. De esta forma, las soluciones que contienen agregados de proteínas del suero solubles presentan una mayor viscosidad (Bryant y McClements, 1998; Vardhanabhuti y Foegeding, 1999; Mleko y Foegeding, 1999).

El comportamiento reológico de suspensiones de proteínas del suero ha sido investigado por diversos autores. Ikeda y col. (2001) estudiaron el comportamiento de suspensiones de diversas variedades de proteínas globulares, entre ellas de β -lactoglobulina (1% de proteína), Albúmina Sérica Bovina (1% de proteína) y α -lactoalbúmina (5% de proteína), mediante reometría dinámica y rotacional. En las suspensiones de β -lactoglobulina y de Albúmina Sérica Bovina se observó un comportamiento pseudoplástico y los espectros mecánicos presentaron un comportamiento predominante sólido en el rango de frecuencias estudiado (0,1 a 100 rad/s). Las suspensiones de α -lactoalbúmina presentaron un comportamiento similar al de un fluido newtoniano, mientras que los barridos de frecuencia no pudieron obtenerse debido a que la respuesta obtenida estuvo por debajo del nivel de sensibilidad del reómetro. Ikeda y col. (2001) estudiaron el comportamiento reológico de suspensiones de β -lactoglobulina (concentración de 0,01 a 7% de proteína en 0,1 mol/dm³ de NaCl) y de suspensiones de WPI (concentración de 0,1 a 10% de proteína en 0,1 mol/dm³ de NaCl), realizando ensayos de fluidez y dinámicos a 20 °C. En las suspensiones de β -lactoglobulina, los autores observaron que los valores de viscosidad presentaron una fuerte dependencia con la velocidad de deformación, mostrando un comportamiento pseudoplástico. Además, los espectros mecánicos de dichas suspensiones presentaron un comportamiento predominantemente sólido (dónde G' fue mayor a G''). En las suspensiones de WPI, se observó el mismo comportamiento pseudoplástico obtenido con las suspensiones de β -lactoglobulina, pero los espectros mecánicos observados evidencian un comportamiento similar al de las soluciones semidiluidas, en dónde G'' es mayor a G' a bajos valores de frecuencia.

Lizarraga, y col. (2006) estudiaron, por medio de ensayos oscilatorios y rotacionales, el comportamiento reológico de suspensiones de proteína del suero en un rango de concentraciones de 2,0 a 32,0% de sólidos totales preparadas a partir de un WPC con 80% de proteína total. Los autores observaron que todas las suspensiones presentaron un comportamiento pseudoplástico y que las suspensiones con 32,0% de WPC presentaron un comportamiento tixotrópico. Además, los espectros mecánicos fueron similares a los de una solución de polímero concentrada.

2.2. Comportamiento reológico de suspensiones de proteína del suero que contienen proteína desnaturalizada y/o agregados proteicos

Se han encontrado escasos trabajos dedicados a analizar el comportamiento reológico de las suspensiones de proteínas del suero que contienen proteína desnaturalizada y/o agregados proteicos. Vardhanabhuti y Foegeding (1999) estudiaron el comportamiento reológico de esta clase de suspensiones por medio de ensayos rotacionales con el objetivo de comparar su viscosidad con el de suspensiones de carbohidratos utilizados habitualmente como agentes espesantes en alimentos. Para ello utilizaron suspensiones con diferentes concentraciones de proteína (8, 9, 10 y 11%) preparadas a partir de un WPI. El tratamiento térmico fue realizado a 80 °C durante diferentes tiempos (1, 3 y 9 h). Los autores observaron que las muestras analizadas presentaron un comportamiento comparable al de las suspensiones de carbohidratos. Mleko y Foegeding (1999) analizaron también el comportamiento de esta clase de suspensiones obtenidas a partir de un tratamiento térmico realizado en dos etapas: calentamiento a 80 °C durante 56-59 min (evitando la formación de un gel), enfriamiento, dilución, ajuste de pH y posterior calentamiento a 80 °C durante 1,5 h. Para la preparación de las mismas se utilizó un WPI y los ensayos reológicos fueron realizados mediante reometría rotacional. Las muestras

presentaron un comportamiento tixotrópico, pseudoplástico y en algunos casos dilatante y reopéctico.

En nuestro sector, el Grupo de Ingeniería de Alimentos y Biotecnología del INTEC, ha estudiado el efecto de la intensidad del tratamiento térmico y del contenido de proteína total sobre el comportamiento reológico de suspensiones de WPC trabajando con un WPC35. Las suspensiones conteniendo un 5 y 9% p/v de proteína total fueron tratadas térmicamente para obtener un 60% de proteína desnaturalizada y/o de agregados proteicos en condiciones suaves (72,5 °C durante 15 min y 72,5 °C durante 40 min, respectivamente) y enérgicas (77,5 °C durante 6 min y 77,5 °C durante 12 min, respectivamente) (Meza y col., 2009).

Los barridos de frecuencia obtenidos en el rango de 0,01 a 10 Hz a 20,0 °C empleando un reómetro con tensión controlada y una geometría cono-plato (diámetro: 60 mm y ángulo: 0,04 rad), permitieron observar un comportamiento característico al de los fluidos viscoelásticos tanto en las suspensiones sin tratamiento térmico como en

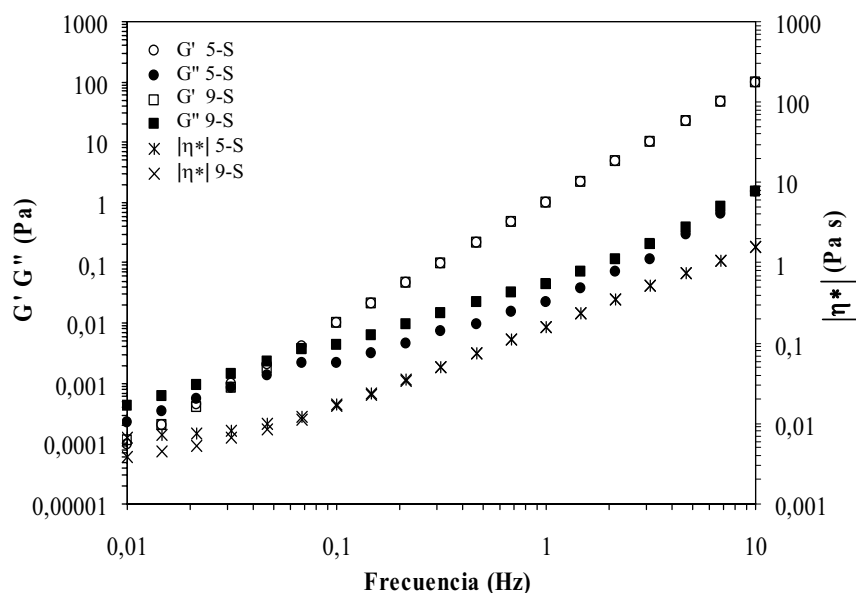


Figura 1. Espectro mecánico de suspensiones de WPC sin tratamiento térmico con 5% p/v (5-S) y 9% p/v (9-S) de proteína total.

las tratadas térmicamente. A bajas frecuencias se observó un comportamiento predominantemente fluido dónde G'' fue mayor a G' y al final de la primera década (0,01 a 0,1 Hz) se produjo un cruce entre G'' y G' (Figuras 1 y 2).

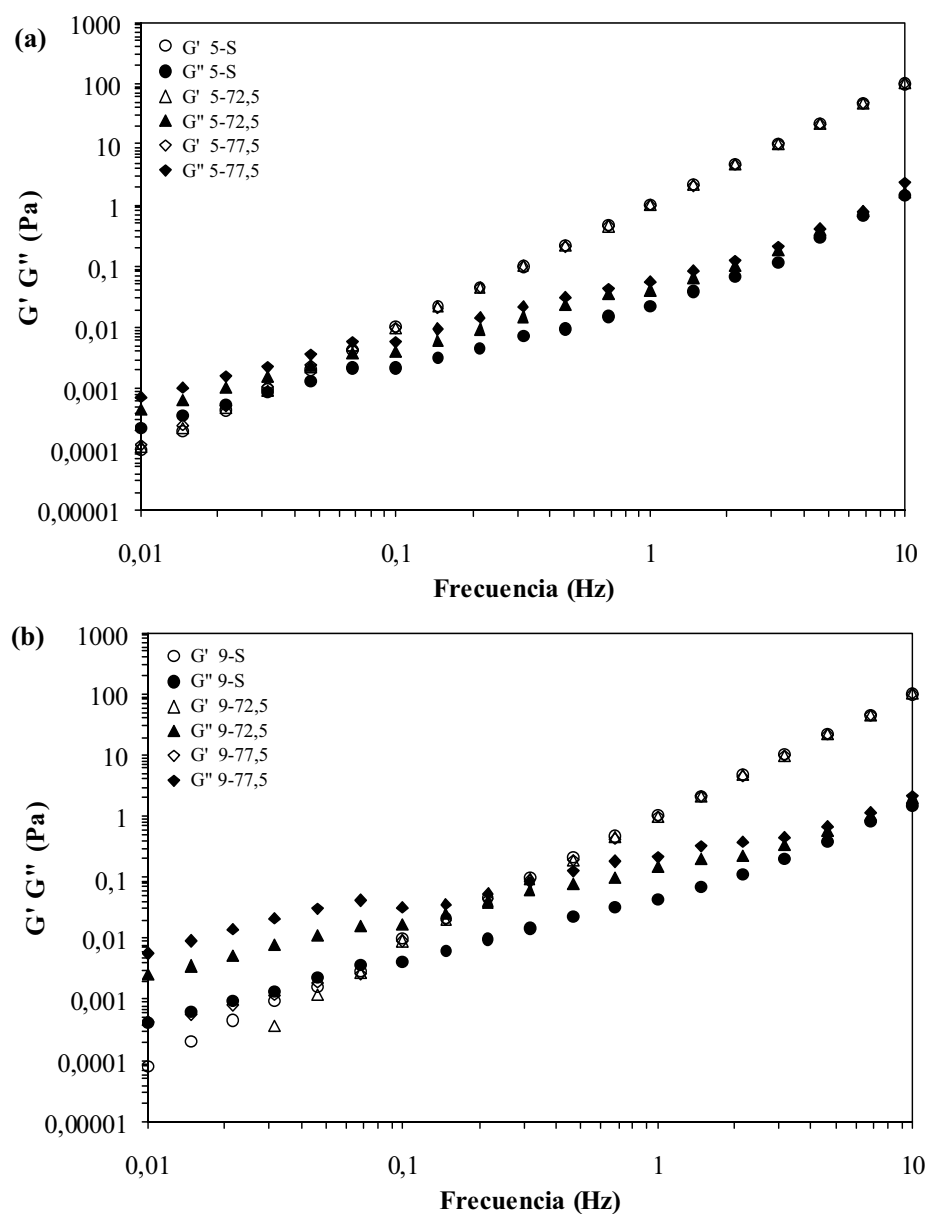


Figura 2. Espectro mecánico de suspensiones de WPC tratadas térmicamente en condiciones suaves (5-72,5 y 9-72,5) y en condiciones enérgicas (5-77,5 y 9-77,5): (a) 5% p/v y (b) 9% p/v de proteína total.

A frecuencias superiores a la frecuencia de corte (ω_c), se visualizó un comportamiento predominantemente sólido donde G' fue mayor a G'' . Además, en las suspensiones se observó una independencia de G' y una escasa dependencia de G'' con el contenido de proteína total en el rango de frecuencias estudiado (Figuras 1 y 2).

Tabla 1. Tiempos característicos de relajación de suspensiones de WPC obtenidos a partir del modelo de Ley de Potencia.

Muestras	Tiempos característicos de relajación [s]*
5-S ¹	7,25±0,73 ^a
9-S ¹	3,51±0,02 ^{bc}
5-72,5 ²	3,68±0,29 ^b
9-72,5 ³	0,64±0,04 ^d
5-77,5 ²	2,43±0,08 ^e
9-77,5 ³	0,63±0,05 ^d

* Letras diferentes en cada columna indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

¹Suspensiones de WPC sin tratamiento con 5% p/v (5-S) y 9% p/v (9-S) de proteína total.

²Suspensiones de WPC con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente en condiciones suaves (5-72,5) y en condiciones enérgicas (5-77,5).

³Suspensiones de WPC con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente en condiciones suaves (9-72,5) y en condiciones enérgicas (9-77,5).

La poca dependencia de los módulos con la concentración también ha sido observada en algunas dispersiones coloidales de proteínas globulares en estado nativo y fue interpretada en términos de la formación de coloides cristalinos (Ikeda y Nishinari, 2001a, b; Ikeda y col., 2001). Los espectros mecánicos de las suspensiones tratadas térmicamente para un mismo contenido de proteína total presentaron una descripción similar al de las suspensiones sin tratamiento térmico. No obstante, existió una dependencia de G'' con la intensidad del tratamiento térmico que se analizó empleando los tiempos característicos de relajación (t_c) calculados como la inversa de ω_c (Tabla 1). Además, en todas las suspensiones de WPC se observó un comportamiento dilatante, donde la viscosidad compleja ($|\eta^*|$) se incrementó con la frecuencia (Figura 1).

Al respecto, Mleko y Foegeding (1999) observaron un comportamiento dilatante en algunas suspensiones que contenían agregados solubles de proteínas del suero obtenidas a partir de suspensiones de WPI tratadas térmicamente en dos pasos. Krešić y col. (2008), quienes analizaron la influencia de nuevas tecnologías (alta presión, ultrasonido y activación tribomecánica) en el comportamiento reológico de suspensiones de WPC y WPI con 10% de proteína, observaron un comportamiento dilatante en las suspensiones control y tratadas. Además, Mleko (2004) publicó que las suspensiones de proteína del suero presentaron un comportamiento tanto dilatante como pseudoplástico dependiendo de la muestra analizada (suero en polvo, suero en polvo desmineralizado, WPC y WPI) en un amplio rango de contenido de proteína total. Sin embargo, otros investigadores han observado un comportamiento pseudoplástico ($|\eta^*|$ disminuye con la frecuencia) en suspensiones de WPC y WPI preparadas con diferentes contenidos de proteína total (Ikeda y col., 2001; Lizarraga y col., 2006). Se ha publicado que el comportamiento dilatante puede provenir de un grado de estructuración de los agregados de WPC durante los ensayos oscilatorios realizados en el reómetro (Walkenström y col., 1999). El comportamiento dilatante puede ser provocado por la fuerza aplicada durante los ensayos, debido a que el material adopta una estructura más ordenada, o por la presencia de grandes interacciones entre las partículas (Mleko y Foegeding, 1999). Se ha demostrado que los ensayos oscilatorios pueden inducir un orden cristalino en suspensiones de esferas rígidas con interacciones de corto alcance, aun cuando las suspensiones mostrasen a simple vista una apariencia líquida (Ackerson y Pusey, 1988; Vermant y Solomon, 2005). De esta forma, durante el flujo de corte puede producirse una modificación en la microestructura del material. La misma estará influenciada por el delicado balance entre las fuerzas repulsivas, el movimiento Browniano y las interacciones hidrodinámicas. A altos valores de tensión de corte, la aglomeración (*clustering*) de las

partículas producida por la presencia de fuerzas hidrodinámicas elevadas provocan la presencia de un comportamiento dilatante.

Los parámetros reológicos derivados del modelo de Ley de Potencia para G' y G'' ($G'=a\omega^x$, $G''=b\omega^y$) permiten analizar el comportamientos de las suspensiones y comparar tratamientos. Los coeficientes a y b representan las magnitudes de G' y G'' respectivamente a una dada frecuencia (1 rad/s) y los exponentes x e y representan la velocidad de variación de los módulos con la frecuencia. Por ejemplo, un exponente x cercano a cero indica que G' no varía con la frecuencia, representando el comportamiento de un sólido viscoelástico, como por ejemplo un gel (Resch y Daubert, 2002). La matriz de un gel tiene la característica de poseer un alto grado de estructuración, por este motivo ejerce una alta resistencia a la deformación que se pone en evidencia con una menor velocidad de variación de los módulos con la frecuencia.

En el caso de las suspensiones analizadas, el exponente x fue significativamente mayor que y en todas las suspensiones analizadas, indicando que G' se incrementa más rápidamente que G'' al aumentar la frecuencia (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros reológicos de las suspensiones de WPC obtenidos a partir del modelo de Ley de Potencia.

Muestras	Módulo elástico (G')		Módulo viscoso (G'')			
	a [Pa s]*	x [-]*	R^2	b [Pa s]*	y [-]*	R^2
5-S ¹	0,025±0,000 ^a	2,011±0,007 ^a	0,99	0,005±0,000 ^a	1,177±0,016 ^{ab}	0,98
9-S ¹	0,024±0,000 ^a	2,019±0,007 ^a	0,99	0,008±0,000 ^a	1,119±0,008 ^c	0,99
5-72,5 ²	0,025±0,001 ^a	2,005±0,009 ^a	0,99	0,008±0,002 ^a	1,106±0,007 ^c	0,99
9-72,5 ³	0,019±0,000 ^a	2,114±0,008 ^a	0,99	0,033±0,002 ^b	0,872±0,021 ^e	0,99
5-77,5 ²	0,026±0,000 ^a	1,987±0,003 ^a	0,99	0,011±0,000 ^a	1,054±0,006 ^d	0,99
9-77,5 ³	0,041±0,009 ^b	1,786±0,093 ^b	0,99	0,066±0,009 ^c	0,728±0,039 ^f	0,96

* Letras diferentes en cada columna indica diferencias significativas ($p<0,05$).

¹ Suspensiones de WPC sin tratamiento con 5% p/v (5-S) y 9% p/v (9-S) de proteína total.

² Suspensiones de WPC con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente en condiciones suaves (5-72,5) y en condiciones enérgicas (5-77,5).

³ Suspensiones de WPC con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente en condiciones suaves (9-72,5) y en condiciones enérgicas (9-77,5).

Es interesante destacar que la magnitud de x es aproximadamente igual a 2, revelando un gran incremento de G' con la frecuencia. Debido a que $|\eta^*| = (|G^*|/\omega)$ y además $|G^*| = [(G'')^2 + (G')^2]^{1/2}$, es posible que el comportamiento dilatante observado en la $|\eta^*|$ en las suspensiones sea el resultado del gran incremento de G' con la frecuencia (Rao y Tattiyakul, 1999). Este comportamiento puede ser atribuido a la estructuración de los agregados solubles de proteína del suero durante los ensayos realizados en el reómetro bajo flujo de corte oscilatorio (Walkenström y col., 1999). Sólo se observaron diferencias significativas entre los valores del exponente y en función del contenido de proteína total, en donde el valor de dicho parámetro fue menor al aumentar el contenido de proteína total. Sin embargo, los tratamientos térmicos provocaron una disminución en los valores de los exponentes x e y , indicando una menor velocidad de variación tanto de G' como de G'' con la frecuencia. Dicho comportamiento puede deberse a un mayor grado de estructuración de las suspensiones tratadas térmicamente debido a la formación de agregados.

2.3. Efecto del proceso de congelación sobre el comportamiento reológico de suspensiones de proteína del suero que contienen proteína desnaturalizada y/o agregados proteicos

La congelación es un tratamiento ampliamente utilizado en la conservación de alimentos. Sin embargo, la formación de cristales de hielo puede producir modificaciones en las propiedades fisicoquímicas del medio (pH, fuerza iónica, concentración de solutos) que generen cambios indeseables, afectando la calidad de los productos. Entre estos cambios se pueden mencionar modificaciones texturales, desnaturalización de las proteínas y destrucción de las membranas celulares debido al efecto de crioconcentración.

Durante la congelación, las proteínas lácteas no son desestabilizadas instantáneamente sino que son alteradas gradualmente. Además, pueden interactuar para formar masas proteicas floculadas que otorgan una apariencia similar a la cuajada a los productos lácteos descongelados. En los productos tradicionales como la leche, la exposición de la misma a varios ciclos de congelación-descongelación puede producir la formación de un delicado gel. Aparentemente, las partículas floculadas en la leche concentrada y descongelada son lo suficientemente numerosas como para formar fácilmente una red tridimensional. Algunos factores que pueden influenciar en la estabilidad de las proteínas durante la congelación de la leche son: la composición, el tratamiento térmico, la homogenización, el almacenamiento previo a la congelación, la velocidad y la temperatura de congelación, la remoción de calcio y la presencia de agentes crioprotectores. La velocidad con la que ocurre la congelación puede influir en la estabilidad proteica de los productos lácteos, encontrándose que una velocidad de congelación lenta provee el tiempo necesario para que se establezca un nuevo equilibrio más favorable. En cuanto al efecto de la temperatura de congelación sobre la estabilidad de las proteínas, estudios previos indican que en la leche descongelada se observa menos precipitado cuanto menor es la temperatura de almacenamiento en freezer.

Bhargava y Jelen (1995) estudiaron el efecto producido por la congelación en algunas propiedades funcionales de suspensiones de proteína del suero preparadas a partir de un WPC comercial con un 76,5% de proteína y observaron que la congelación no afectó significativamente las propiedades funcionales medidas en las suspensiones con un pH 6,8. Sin embargo, cuando las suspensiones fueron preparadas a pH 5, la congelación modificó, aunque en muy poca proporción, la viscosidad y la fuerza de los geles formados.

En nuestro sector, el Grupo de Ingeniería de Alimentos del INTEC, ha estudiado el efecto del proceso de congelación sobre el comportamiento reológico de

suspensiones de WPC tratadas térmicamente según lo descrito en la Sección 2.2. Los espectros mecánicos de las suspensiones congeladas para un mismo contenido de proteína total presentaron una descripción similar al de las suspensiones sin tratamiento térmico. No obstante, se observó una dependencia de G'' con los tratamientos realizados (datos no mostrados)

La congelación provocó una disminución en los valores de los exponentes x e y en las suspensiones sin tratamiento térmico y congeladas, indicando una menor velocidad de variación de G'' con la frecuencia. Este fenómeno puede deberse a la presencia de un mayor grado de estructuración en las suspensiones sin tratamiento térmico congeladas. Durante el proceso de congelación, cuando se forman los cristales de hielo, se produce la concentración de los solutos solubles en agua presentes en el alimento (como por ejemplo sales minerales). La crioconcentración de los solutos puede impactar significativamente en la estabilidad de las proteínas (Franks y Hatley, 1991). Además, el aumento en la concentración de las proteínas durante la congelación puede provocar la agregación de las mismas (Tolstoguzov y Braudo, 1983, Franks y Hatley, 1991).

No obstante, la congelación provocó un aumento en los valores de los exponentes x e y de las suspensiones tratadas térmicamente y congeladas, indicando una mayor velocidad de variación de G' y G'' con la frecuencia. Este fenómeno puede deberse a la presencia de un menor grado de estructuración de las suspensiones tratadas térmicamente congeladas. La formación de cristales de hielo durante la congelación puede producir modificaciones en la estructura de los alimentos alterando la calidad de los productos (Fenema y col., 1973). Estas observaciones explicarían la posible modificación o ruptura de la estructura de los agregados solubles de proteínas del suero debido a la formación de hielo, que se pone de manifiesto con un aumento en los valores del exponente y .

2.4. Comportamiento reológico de quesos elaborados con proteínas del suero

Se han encontrado numerosas investigaciones acerca de los cambios de los parámetros reológicos empíricos (dureza, adhesividad, cohesividad, frakturabilidad) durante la maduración de distintas variedades de quesos elaborados con proteínas del suero (Simplese® y Dairy-Lo™) (Kavas y col., 2004; Koka y Metin, 2004; Sahan y col., 2008). Sin embargo, se han encontrado escasos trabajos dedicados a estudiar el comportamiento reológico de quesos elaborados con proteínas del suero mediante ensayos fundamentales.

Zalazar y col. (2002) estudiaron el comportamiento viscoelástico de un queso Cremoso Argentino bajo en grasa elaborado con Dairy-Lo™ al final del período de maduración (20 días), realizando barridos de frecuencia (0,1 a 9,6 Hz) a 30 °C. Los autores analizaron los módulos G' , G'' y $|G^*|$ y llegaron a la conclusión que el comportamiento reológico de los quesos no fue afectado por la adición de Dairy-Lo™ en comparación con un queso control. Ma y col. (1997) analizaron el comportamiento reológico de un queso Cheddar bajo en grasa elaborado con Dairy-Lo™ a los tres meses de almacenamiento, realizando barridos de frecuencia en el rango de 0,05 a 20 Hz a una temperatura de 20 °C. Los autores analizaron estadísticamente los valores de los módulos G' y G'' a 0,05, 0,7 y 10 Hz y concluyeron que los quesos elaborados con Dairy-Lo™ presentaron valores de G' y G'' menores al de un queso control.

En la Tesis Doctoral desarrollada en este tema, se estudió el comportamiento reológico durante la maduración de quesos elaborados con Simplese®. Se utilizaron 12 quesos blandos magros elaborados con proteínas del suero (Simplese® D100, NutraSweet Co., Deerfield, Estados Unidos) recién producidos en una empresa láctea local, salados y envasados al vacío en bolsas plásticas que fueron almacenados en cámara a 6 °C para su maduración. Se tomaron muestras de los quesos a diferentes días de maduración: 1, 21, 48 y 76 días. Luego, se obtuvieron cubos representativos de 30 mm y posteriormente láminas de 3 mm de espesor que fueron colocadas en

recipientes herméticos y fueron almacenados en heladera a 5 °C hasta la determinación de las propiedades reológicas.

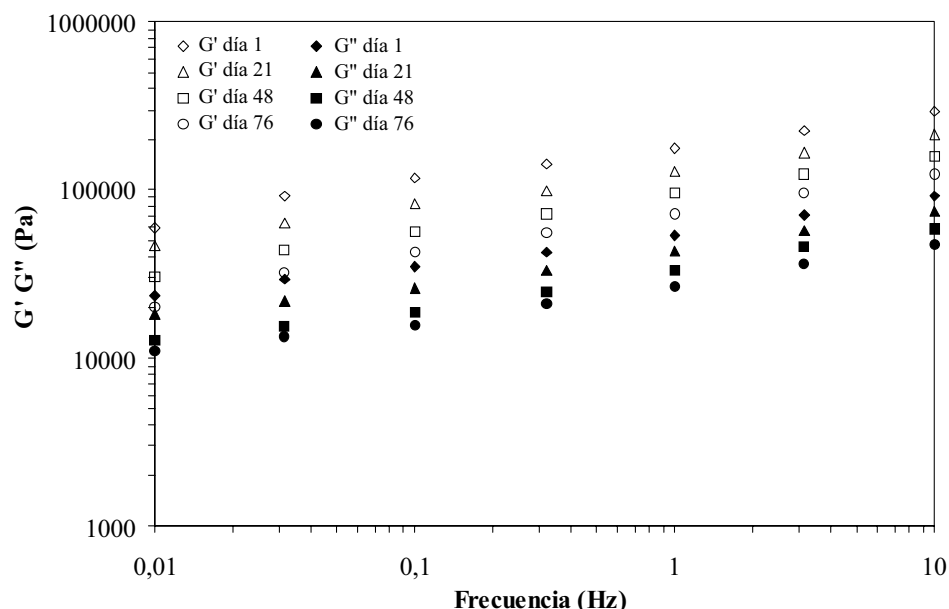


Figura 3. Espectro mecánico de un queso blando elaborado con proteínas del suero.

Los barridos de frecuencia obtenidos en el rango de 0,01 a 10 Hz a 20 °C empleando un reómetro con tensión controlada y una geometría plato-plato (diámetro: 20 mm y distancia entre platos: 2,5 mm) permitieron observar que G' fue mayor a G'' en todo el rango de frecuencias estudiado, evidenciando un comportamiento predominantemente sólido a cualquier día de maduración (Figura 3). De acuerdo con Steffe (1992), esta descripción del espectro mecánico es característica de los sólidos viscoelásticos. Similares resultados fueron observados por Ma y col. (1997) en un queso Cheddar magro elaborado con Dairy-Lo™ y por otros autores en varios tipos de quesos bajos en grasa (Subramanian y Gunasekaran, 1997). Se observó una dependencia tanto de G' como de G'' con el tiempo de maduración en el rango de frecuencias estudiado, en donde ambos módulos disminuyen al aumentar el tiempo de

maduración.

Los parámetros reológicos derivados del modelo de Ley de Potencia para G' y G'' permiten analizar el comportamiento reológico durante la maduración de los quesos. El exponente x fue significativamente mayor que y en todas las muestras de queso analizadas, indicando que G' se incrementa más rápidamente que G'' al aumentar la frecuencia (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros reológicos obtenidos a partir del modelo de Ley de Potencia para el módulo elástico ($G'=a\omega^x$) y el módulo viscoso ($G''=b\omega^y$) de un queso blando elaborado con proteínas del suero.

Tiempo de maduración [días]	Módulo elástico (G')			Módulo viscoso (G'')		
	a [Pa s]*	x [-]*	R^2	b [Pa s]*	y [-]*	R^2
1	121,1±5,2 ^a	0,217±0,001 ^a	0,99	39,5±1,5 ^a	0,185±0,002 ^a	0,99
21	79,2±16,1 ^b	0,231±0,011 ^{ab}	0,99	28,8±5,5 ^b	0,210±0,011 ^b	0,99
48	72,1±10,6 ^b	0,236±0,008 ^{ab}	0,99	25,6±3,5 ^{bc}	0,233±0,008 ^b	0,99
76	43,9±4,5 ^c	0,248±0,017 ^b	0,99	17,7±1,5 ^c	0,215±0,011 ^b	0,99

*Letras diferentes en cada columna indica diferencias significativas ($P<0,05$).

Durante la maduración de los quesos, se observó una tendencia decreciente en los parámetros a y b , encontrándose diferencias significativas entre los valores de a de los días 1 y 48 de maduración y entre los valores de b de los días 21 y 76. Por otro lado, también se observó que los valores de ambos exponentes x e y aumentaron significativamente entre los días 1 y 21 de maduración, permaneciendo constantes el resto del tiempo. Estas observaciones demostraron que los tanto G' como G'' presentaron una mayor velocidad de variación con la frecuencia durante la maduración, indicando que disminuyó el grado de estructuración de la red de caseína (Gravier y col., 2004). Además, los valores de los módulos G' y G'' a una frecuencia determinada (representado por los valores de a y b) disminuyeron durante la maduración. Los productos provenientes de la hidrólisis de las caseínas son solubles en agua y no contribuyen a formar la red de caseína (Ustunol y col., 1995). De esta forma, la pérdida de estructura de las proteínas debido a la proteólisis implica una

disminución en los valores de G' durante la maduración. La disminución en los valores de G'' observados puede ser atribuida a la producción de grupos iónicos que tienen la capacidad de ligar agua, reduciendo de esta forma la disipación viscosa durante la maduración (Creamer y Olson, 1982; Ak y Gunasekaran, 1996, Dave y col., 2003).

2.5. Efecto del proceso de congelación sobre el comportamiento reológico de quesos elaborados con proteínas del suero

En el Grupo de Ingeniería de Alimentos y Biotecnología del INTEC, se ha estudiado el efecto del proceso de congelación sobre la maduración de quesos elaborados con proteínas del suero. De acuerdo al procedimiento detallado en la Sección 2.4, doce quesos fueron sometidos al proceso de congelación (congelación a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que el centro alcanzó dicha temperatura, almacenamiento del producto congelado a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 33 días y descongelación a $6\text{ }^{\circ}\text{C}$). Los espectros mecánicos de los quesos sometidos al proceso de congelación presentaron una descripción similar al de los quesos control. No obstante, se observó que dichos quesos presentaron valores significativamente mayores del parámetro a del modelo de Ley de Potencia en comparación con los quesos control. Estos resultados indican que únicamente el módulo G' fue afectado por el proceso de congelación, posiblemente debido a la deshidratación local de las proteínas que provoca la ruptura de la estructura del queso luego de la congelación (Diefes y col., 1993).

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), de la República Argentina, por el financiamiento aportado y al CYTED (Proyecto 105PI0274) por las colaboraciones brindadas.

Referencias

- Ackerson, B. J. y Pusey, P. N. (1988). Shear-induced order in suspensions of hard spheres. *Physical Reviews Letter*, 61, 1033-1036.
- Ak, M. M. y Gunasekaran, S. (1996). Dynamic rheological properties of Mozzarella cheese during refrigerated storage. *Journal of Food Science*, 61, 566-576.
- Banks, J. M. (2004). The technology of low-fat cheese manufacture. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 199-207.
- Bhargava, A., Jelen, P. (1995). Freezing of whey protein concentrate solutions and its effect on protein functionality indicators. *International Dairy Journal*, 5, 533-54.
- Bryant, C. M. y McClements, D. J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 143-151.
- Creamer, L. K. y Olson, N. F. (1982). Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 47, 631-636, 646.
- Dave, R. I., Sharma, P., Muthukumarappan, K. (2003). Effects of starter culture and coagulating enzymes on viscoelastic behavior and melt of mozzarella Cheese. *Journal of Food Science*, 68, 1404-1410.
- de Wit, J. N., Klarenbeek, G., Adamse, M. (1986). Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. 2. Effects of processing history and composition. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 40, 41-56.
- Diefes, H. A., Rizvi, S. H., Bartsch, J. A. (1993). Rheological behavior of frozen and thawed low-moisture part-skim Mozzarella cheese. *Journal of Food Science*, 58, 764-769.
- Fenema O., Powrie W., Narth E. (1973). *Low temperature preservation of food and living matter*. New York: Marcel Dekker.
- Franks, F. y Hatley, R. H. M. (1991). Stability of proteins at subzero temperatures: thermodynamics and some ecological consequences. *Pure & Applied Chemistry*, 63, 1367-1380.
- Gravier, N. G., Zaritzky, N. E., Califano, A. N. (2004). Viscoelastic behavior of refrigerated and frozen low-moisture Mozzarella cheese. *Journal of Food Science*, 9, 123-128.
- Hinrichs, J. (2001). Incorporation of whey proteins in cheese. *International Dairy Journal*, 11, 495-503.
- Huffman, L. M. (1996). Processing whey protein for use as a food ingredient. *Food Technology*, 50, 49-52.

- Ikeda, S. y Nishinari, K. (2001a). On solid-like rheological behavior of globular protein solutions. *Food Hydrocolloids*, 15, 401–406.
- Ikeda, S. y Nishinari, K. (2001b). Solid-like mechanical behavior of ovalbumin aqueous solutions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28, 315-320.
- Ikeda, S., Nishinari, K., Foegeding, E. A. (2001). Mechanical characterization of network formation during heat-induced gelation of whey protein dispersions. *Biopolymers*, 56, 109-119.
- Kavas, G., Oysun, G., Kinik, O., Uysal, H. (2004). Effect of some fat replacers on chemical, physical and sensory attributes of low-fat white pickled cheese. *Food Chemistry*, 88, 381–388.
- Koca, N. y Metin, M. (2004). Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh Kashar cheeses produced by using fat replacers. *International Dairy Journal*, 14, 365-373.
- Krešić, G., Lelas, V., Jambrak, A. R., Herceg, Z., Brnčić, S. R. (2008). Influence of novel food processing technologies on the rheological and thermophysical properties of whey proteins. *Journal of Food Engineering* 87, 64-73.
- Lizarraga, M. S., De Piante Vicin, D., Gonzalez, R., Rubiolo, A., Santiago, L. G. (2006). Rheological behaviour of whey protein concentrate and λ -carrageenan aqueous mixtures. *Food Hydrocolloids*, 20, 740–748.
- Lo, C. G. y Bastian E. D. (1998). Incorporation of native and denatured whey pproteins into cheese curd for manufacture of reduced fat, Havarty-type cheese. *Journal of Dairy Science*, 81, 16-24.
- Ma, L., Drake, M. A., Barbosa-Canovas, G. V., Swanson, B. G. (1997). Rheology of full-fat and low-fat Cheddar cheeses as related to type of fat mimetic. *Journal of Food Science*, 62, 748-752.
- McDonough, F. E., Hargrove, R. E., Mattingly, W. A., Posati, L. P., Alford, J. A. (1974). Composition and properties of whey protein concentrates from ultrafiltration. *Journal of Dairy Science*, 57, 1438-1443.
- Meza, B. E., Verdini, R. A., Rubiolo A. C. (2009). Viscoelastic behaviour of heat-treated whey protein concentrate suspensions. *Food Hydrocolloids*, 23, 661–666.
- Mistry, V. V. (2001). Low fat cheese technology. *International Dairy Journal*, 11, 413–422.
- Mleko, S. (2004). Rheological properties of whey products dispersions. *Milchwissenschaft*, 59, 287-290.

- Mleko, S. y Foegeding, E. A. (1999). Formation of whey protein polymers: effects of a two-step heating process on rheological properties. *Journal of Texture Studies*, 30, 137–149.
- Morr, C. V. (1985). Composition, physicochemical and functional properties of reference whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 50, 1406–1411, 1421.
- Morr, C. V. y Foegeding, E. A. (1990). Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: a status report. *Food Technology*, 44, 100–112..
- Rao, M. A. y Tattiyakul, J. (1999). Granule size and rheological behavior of heated tapioca starch dispersions. *Carbohydrate Polymers*, 38, 123–132.
- Resch, J. J. y Daubert, C. R. (2002). Rheological and physicochemical properties of derivatized whey protein concentrate powders. *International Journal of food Properties*, 5, 419–434.
- Rodríguez, J. (1998). Recent advances in the development of low-fat cheeses. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 249–254.
- Sahan, N., Yasar, K., Hayaloglu, A. A., Karaca, O. B., Kaya, A. (2008). Influence of fat replacers on chemical composition, proteolysis, texture profiles, meltability and sensory properties of low-fat Kashar cheese. *Journal of Dairy Research*, 75, 1–7.
- Sanchez, C., Beauregard, J. L., Bimbenet, J. J., Hardy, J. (1996). Flow properties, firmness and stability of double cream cheese containing whey protein concentrate. *Journal of Food Science*, 61, 843–846.
- Santoro, M. y Faccia, M. (1996). Degradation of the protein fraction in a cheese fortified with whey proteins. *Netherlands Milk & Dairy Journal*, 50: 61–68.
- Schaller, A. (2009). *Sueros de Lechería*. Cadenas Alimentarias. Alimentos Argentinos, 44, 20–24. <http://www.alimentosargentinos.gov.ar>
- Singer, N. S. (1996). Microparticulated proteins as fat mimetics. In S. Roller & S. A. Jones, *Handbook of Fat Replacers* (Capítulo 8). New York: CRC Press.
- Singer, N. S., Yamamoto, S., Latella, J. (1988). *Protein product base*. Eur. Pat. Appl. 0,250,623, John Labatt Ltd.
- Steffe, J. F. (1992). *Rheological methods in food process engineering*. Miami: Freeman Press.
- Subramanian, R. y Gunasekaran, S. (1997). Small amplitude oscillatory shear studies on mozzarella cheese. Part II: Relaxation spectrum. *Journal of Texture Studies*, 28, 643–656.

- Tolstoguzov, V. B. y Braudo, E. E. (1983). Fabricated foodstuffs as multicomponent gels. *Journal of Texture Studies*, 14, 183–212.
- Ustunol, Z., Kawachi, K., Steffe, J. (1995). Rheological properties of Cheddar cheese as influenced by fat reduction and ripening time. *Journal of Food Science*, 60, 1208–1210.
- Vardhanabhuti, B. y Foegeding, E. A. (1999). Rheological properties and characterization of polymerized whey protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3649–3655.
- Vermant, J., Solomon, M. J. (2005). Flow-induced structure in colloidal suspensions. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 17, R187–R216.
- Walkenström, P., Nielsen, M., Windhab, E., Hermansson, A. M. (1999). Effects of flow behaviour on the aggregation of whey protein suspensions, pure or mixed with xanthan. *Journal of Food Engineering*, 42, 15–26.
- Zalazar, C. A., Zalazar, C. S., Bernal, S., Bertola, N., Bevilacqua, A., Zaritzky, N. (2002). Effect of moisture level and fat replacer on physicochemical, rheological and sensory properties of low fat soft cheeses. *International Dairy Journal*, 12, 45–50.

Implicaciones de las propiedades interfaciales en las características espumantes de proteínas lácteas.

Juan M. Rodríguez Patino, M^a. Rosario Rodríguez Niño y Cecilio Carrera Sánchez
Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química, Universidad de Sevilla.
C/ Prof. García González, 1, E-41012-Sevilla (España).
Tel.: 34 954 556446. Fax: 34 954 556447
E-mail. jmrodri@us.es

Resumen

El principal objetivo de la industria alimentaria es la de producir productos que tengan un impacto en el consumidor. Entre éstos, las dispersiones o coloides alimentarios (espumas, emulsiones, geles), que incluyen a alimentos tradicionales y a nuevas formulaciones de alimentos, ocupan un lugar destacado. La producción y estabilización de estas dispersiones requieren el concurso de sustancias conocidas como agentes emulsionantes o espumantes (proteínas, lípidos, fosfolípidos, tensioactivos, polisacáridos, etc.), cuya función es la de situarse en las interfases fluidas que separan las partículas de la fase dispersa.

El objetivo de este capítulo se ha centrado en analizar la influencia de las propiedades de una película de agente espumante (especialmente de las proteínas lácteas) sobre las características espumantes de sus disoluciones acuosas, como modelo de una formulación alimentaria. Se trata de optimizar las características macroscópicas de una dispersión alimentaria modelo (una espuma) a través del control de la formación de nanoestructuras del agente espumante sobre la interfase fluida.

1. Introducción

Muchos alimentos naturales o procesados son dispersiones o han consistido en una dispersión durante alguna de las etapas de su producción. Además, la mayoría de estas dispersiones son emulsiones y espumas (Dickinson, 1992; McClements, 2005). Estas dispersiones incluyen a formulaciones tradicionales de alimentos, tales como productos de panadería, bollería, pastelería, productos cárnicos, helados, postres, etc., o a nuevas formulaciones, entre las que destacan los alimentos con bajo contenido de grasas e instantáneos, las formulaciones con bajo o elevado contenido de alcohol, alimentos funcionales (alimentos infantiles, formulaciones enterales o parenterales, alimentos con valores nutricionales específicos, etc.), etc. Por lo tanto, el análisis de las dispersiones o coloides alimentarios es de importancia práctica.

Las dispersiones alimentarias no se forman espontáneamente. Para producir una dispersión se requiere el aporte de una gran cantidad de energía mecánica para incrementar el área interfacial alrededor de las gotitas de una emulsión o de las burbujas de una espuma. Esta energía libre es proporcional a la tensión superficial o interfacial. Pero, además, las dispersiones son termodinámicamente inestables. Sin embargo, desde un punto de vista práctico es posible producir una dispersión cinéticamente estable (o metaestable) por un periodo de tiempo, que es el que exige el consumidor para cada producto en cuestión. Para ello se han de incluir en la formulación determinadas sustancias conocidas como emulsionantes o agentes espumantes (Dickinson, 1992; McClements, 2005).

En formulaciones de alimentos se incluyen dos categorías de emulsionantes: los emulsionantes de bajo peso molecular (principalmente lípidos, fosfolípidos y algunos tensioactivos permitidos) y las macromoléculas (principalmente las proteínas y algunos polisacáridos o hidrocoloides). Desde un punto de vista fundamental, los emulsionantes que forman la película interfacial en una emulsión pueden ser modelados como una monocapa. Por lo tanto, las interacciones entre las gotitas de la

fase dispersa, que en definitiva determinan la estabilidad de la emulsión, dependen de las características de esta monocapa. Las burbujas en una espuma se estabilizan por una bicapa de moléculas del agente espumante separadas por la fase acuosa continua. Por lo tanto, las características de esta película delgada determinan la estabilidad de la espuma (Dickinson, 1992, 2003a & b, 2006; Foedeging y col., 2006; Rodríguez Patino y col., 2008).

El análisis de las características interfaciales de estos emulsionantes o agentes espumantes sobre interfases fluidas es de importancia práctica, porque estas monocapas constituyen modelos bien definidos para el análisis de las dispersiones alimentarias a niveles microscópicos y nanoscópicos, con numerosas ventajas para realizar estudios fundamentales (Horne & Rodríguez Patino, 2003; Rodríguez Patino y col., 2003 & 2007c; Miller y col., 2004; Wilde y col., 2004; Mackie & Wilde, 2005; Akensenko y col., 2006). En efecto: (i) se necesitan concentraciones muy pequeñas de agente emulsionante o espumante. La cantidad de muestras que se maneja es también pequeña. (ii) Es posible obtener información acerca de la formación y estabilidad de la película interfacial. (iii) Y por estas razones su análisis tiene aplicación directa en la producción de dispersiones alimentarias.

En estos estudios debemos tener siempre presente que el principal objetivo de la industria alimentaria es la de producir productos que tengan un impacto en el consumidor. A una escala macroscópica, muchos de estos productos son emulsiones o espumas, como anteriormente se ha indicado. A esta escala macroscópica las propiedades físicas, tales como la estabilidad, las propiedades reológicas y la textura del alimento son de gran importancia. Como entidades estructurales de las dispersiones alimentarias a una escala microscópica cabe destacar a las gotitas de agua o de aceite de la fase dispersa en las emulsiones y a las burbujas de gas en las espumas. Finalmente, a un nivel molecular, la forma en la que los emulsionantes interaccionan entre sí en la propia interfase tiene una gran influencia sobre la

formación y estabilidad de las partículas individuales y de la interacción entre ellas (McClements, 2005). El componente clave de esta aproximación nanoscópica es la auto-asociación molecular sobre las interfases fluidas.

Por lo tanto, el objetivo de nuestro trabajo es el de analizar la forma de mejorar las características macroscópicas de una dispersión alimentaria a través del control de la formación de nanoestructuras de los emulsionantes o agentes espumantes sobre las interfases fluidas.

2. Funciones de una proteína sobre una interfase fluida

La formación, estabilidad y propiedades mecánicas de las dispersiones alimentarias (espumas) dependen de las características físico-químicas interfaciales de estos emulsionantes alimentarios (Figura 1) (Rodríguez Patino y col., 2008). Esta

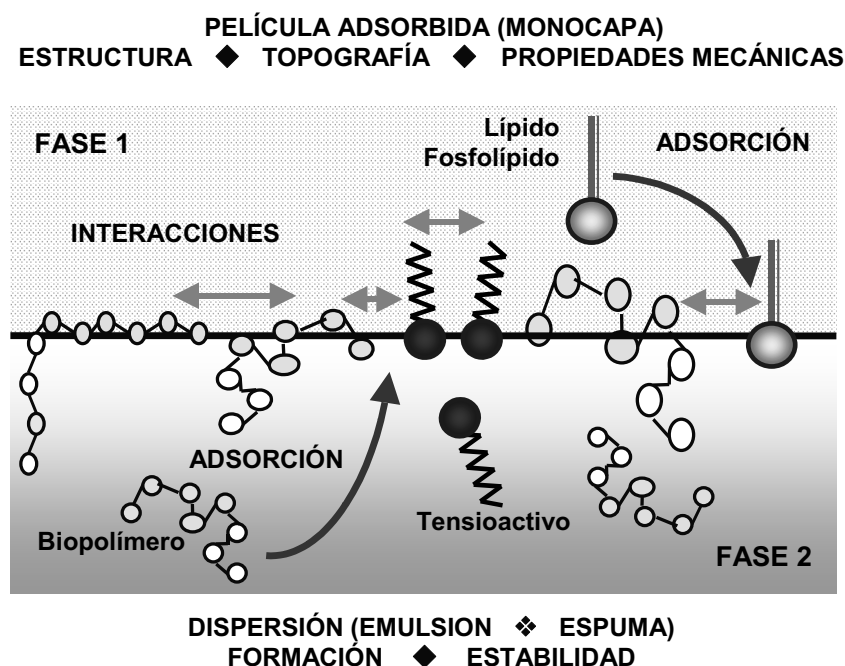


Figura 1. Implicaciones de las características interfaciales de las películas adsorbidas de emulsionantes alimentarios (biopolímeros, lípidos, fosfolípidos, tensioactivos permitidos, etc.) sobre la formación y estabilidad de una dispersión (emulsión o espuma).

es la forma mediante la cual las características microscópicas de una dispersión alimentaria pueden ser controladas o promovidas a través de las propiedades microscópicas o nanoscópicas de los emulsionantes empleados para su producción y que constituyen los fundamentos de la ingeniería de producto o de la formulación. En lo que sigue, se considerará la conexión entre las características interfaciales y espumantes de los agentes espumantes, considerando como tales a las proteínas lácteas.

2.1. Adsorción de la proteína sobre la interfase aire-agua.

En un primer lugar se ha de considerar la adsorción de la proteína sobre la interfase, porque esta etapa ejerce una función muy importante sobre la formación de la espuma. La cinética de adsorción de una proteína sobre la interfase aire-agua puede seguirse a través de la evolución con el tiempo de la presión superficial o de las propiedades mecánicas de la película (bajo condiciones de dilatación o de cizalla) (Figura 2). La adsorción de una proteína sobre la interfase tiene lugar a partir de tres mecanismos: (i) durante la primera etapa, a bajas presiones superficiales, la cinética está controlada por la velocidad de difusión de la proteína hacia la interfase, (ii) en una segunda etapa la proteína se adsorbe, penetra y se despliega sobre la interfase y, finalmente, (iii) en una tercera etapa, tiene lugar la reordenación de la proteína sobre la interfase produciendo en muchas ocasiones una película gelificada.

En ocasiones, la adsorción de una proteína sobre una interfase fluida va precedida de un tiempo de inducción. En términos físico-químicos, éste es el tiempo que transcurre para que las interacciones entre las moléculas de la proteína en la vecindad de la interfase tengan repercusión sobre alguna propiedad interfacial mensurable, como la presión superficial (Figura 2A) o las propiedades reológicas superficiales (Figura 2B y C).

En general, el tiempo de inducción disminuye o desaparece, la velocidad de difusión aumenta y las propiedades mecánicas de las películas adsorbidas mejoran con el aumento de la concentración de proteína en disolución.

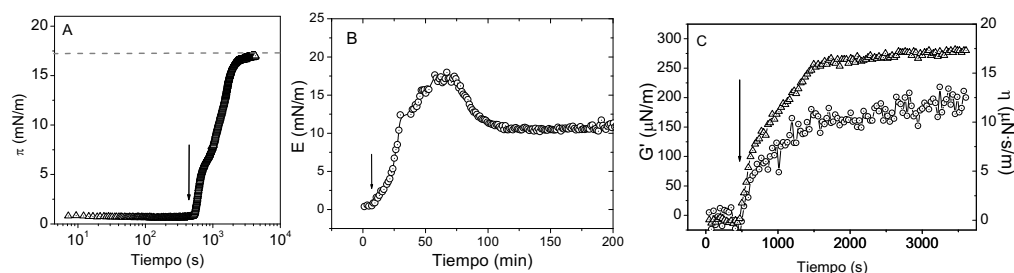


Figura 2. Evolución con el tiempo de (A) presión superficial, (B) módulo dilatacional superficial y (C) componentes elástica G' y viscosa (η) del módulo de cizalla durante la adsorción de una película de β -caseína sobre la interfase aire-agua (Lucero, 2005). Temperatura 20 °C, pH = 7 y fuerza iónica 0.05 M. Las flechas verticales indican el tiempo de inducción.

Una vez alcanzado el equilibrio, durante la adsorción de la proteína, la representación de la presión superficial frente a la concentración de proteína en disolución constituye la isoterma de adsorción (Figura 3) (Rodríguez Niño y col., 2001).

La isoterma de adsorción puede interpretarse en términos de cantidad de proteína adsorbida sobre la interfase aire-agua. A bajas concentraciones de proteína en disolución (C), cuando el valor de la presión superficial (π) está próximo a cero, los residuos de proteína adsorbidos pueden considerarse como formando una película ideal con pocas interacciones entre ellos. A mayores valores de C, pero inferiores al

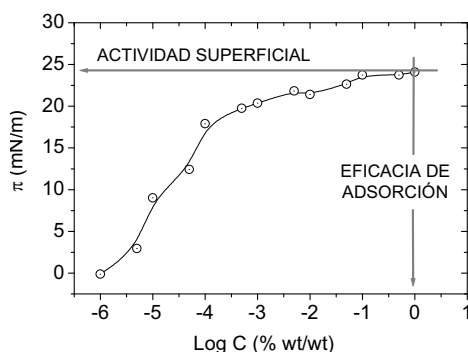


Figura 3. Isoterma de adsorción de una película de β -caseína sobre la interfase aire-agua (Rodríguez Niño y col., 2001). Temperatura 20 °C, pH = 7 y fuerza iónica 0.05 M. La máxima presión superficial, correspondiente a una película de proteína saturada se denomina **actividad superficial**. La concentración de proteína a la cual la presión superficial se hace máxima se denomina **eficacia de adsorción**.

correspondiente al *plateau*, se forma una monocapa de moléculas adsorbidas irreversiblemente. Finalmente, cuando se alcanza el *plateau*, la presión superficial se hace máxima y la monocapa está saturada por la proteína e, incluso, tiene lugar la formación de multicapas.

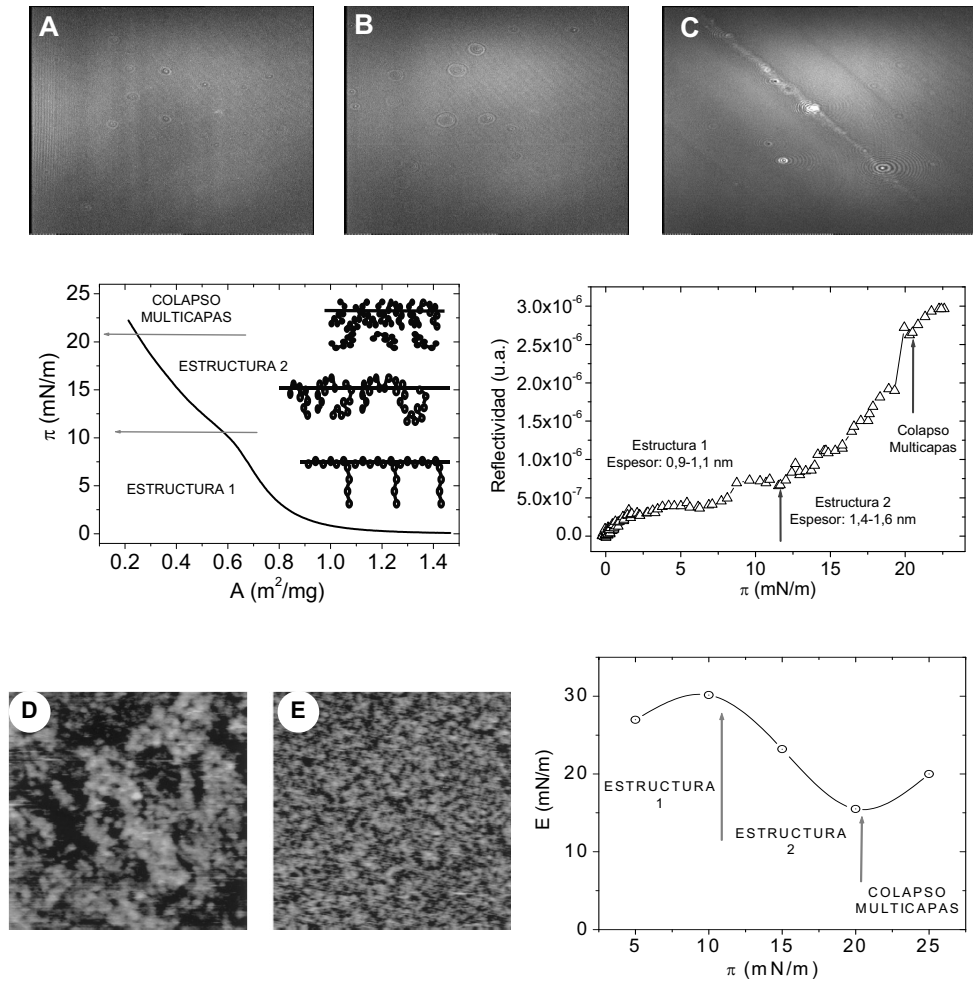


Figura 4. Isotherma π -A y variaciones de la reflectividad de la interfase y del módulo dilatacional superficial (E) con la presión superficial para películas de β -caseína sobre la interfase aire-agua. Temperatura 20 °C, pH = 7 y fuerza iónica 0.05 M.

Se incluyen las imágenes BAM (A-C: 470 x 600 μ m) y de AFM (D y E: 400 nm) (Gunning *et al.*, 1996), correspondientes a las estructura 1 (A y D) y 2 (B y E) y al colapso (C) de la monocapa.

2.2. Estructura y topografía de la película de proteína adsorbida.

Sobre la interfase, las características de las películas adsorbidas dependen de las interacciones entre sus moléculas. Por lo tanto, desde un punto de vista fundamental, la estructura y topografía de estas monocapas son de gran interés. La estructura de la película se puede determinar a partir de la isoterma de presión superficial (π)-área (A) (Rodríguez Patino y col., 1999). Para el caso de la β -caseína, la monocapa sobre la interfase aire-agua adopta las estructuras 1 (formando filas de aminoácidos) y 2 (formando lazos y colas), antes de que se produzca el colapso de la monocapa y la formación de multicapas a las mayores presiones superficiales (Figura 4).

La topografía de la monocapa observada mediante microscopía de ángulo Brewster (BAM: imágenes A-C) o de fuerza atómica (AFM: imágenes D y E) confirma a escala microscópica y nanoscópica estas estructuras (Rodríguez Patino y col., 1999; Lucero, 2005). Aunque mediante el BAM no pueden apreciarse diferencias en la morfología de las estructuras 1 y 2 de la película de β -caseína (ver imágenes A y B), mediante el AFM, con un mayor poder de resolución, se aprecian diferencias entre la morfología de ambas estructuras (ver imágenes D y E), en la densidad superficial y en el espesor de la película. El colapso de la monocapa y la formación de multicapas se detecta por la presencia de pliegues en la interfase (ver imagen C) y por el aumento de la reflectividad y espesor de la monocapa, respectivamente (Figura 4).

Las características estructurales y topográficas de las monocapas son diferentes para proteínas desordenada (p.e., β -caseína) y globulares (p.e., β -lactoglobulina). Además, las condiciones medioambientales (temperatura, pH, fuerza iónica, sales, presencia de lípidos o fosfolípidos, etc.) y las modificaciones físicas, químicas y enzimáticas tienen incidencia directa sobre las características estructurales y mecánicas de las películas de proteínas (Horne & Rodríguez Patino, 2003;

Rodríguez Patino y col., 2003 & 2007; Rodríguez Niño y col., 2005; Álvarez y col., 2006; Pizones y col., 2007a, b & c).

2.3. Propiedades mecánicas de la película adsorbida.

La mayoría de los sistemas que contienen emulsionantes sobre las interfases fluidas están sometidos a procesos dinámicos, de no equilibrio. Estos fenómenos dinámicos y el desarrollo de interacciones intermoleculares pueden conducir a alteraciones de las propiedades dinámicas de la interfase que tienen consecuencias reológicas mensurables. En efecto, durante la adsorción de la proteína se produce un aumento de las propiedades mecánicas como consecuencia de las mayores interacciones entre los grupos de amino-ácidos adsorbidos en la interfase (Figuras 2B y C). Además, las características reológicas son muy sensibles a las estructuras que la monocapa adopta sobre la interfase (Figura 4) (Lucero, 2005).

La importancia práctica de estos estudios es que las características estructurales, topográficas y mecánicas de las películas de una proteína modelo (β -caseína) analizadas en este apartado son esencialmente similares a las de una proteína comercial (caseinato sódico) (Rodríguez Niño y col., 2005).

3. Características espumantes de una proteína.

De entre todas las propiedades funcionales de las proteínas, la formación de espumas es de gran interés porque estas espumas proporcionan la textura de muchos productos aireados (Campbell & Mougeot, 1999a & b; Dickinson, 2003a). Las espumas están presentes en muchos alimentos, bien en el producto terminado o incorporada durante su etapa de producción, en un proceso preliminar, que puede estar sujeto a posteriores etapas de procesado. Por lo tanto, el conocimiento de los mecanismos de

formación y estabilidad de una espuma es esencial si se requiere producir una espuma con unas características determinadas.

Una espuma, como cualquier dispersión es termodinámicamente inestable, y su estabilidad relativa está afectada por tres factores (Figura 5): (i) el drenaje del líquido inicialmente presente en la espuma, (ii) la difusión del gas desde las burbujas de menor tamaño a las mayores y, finalmente, (iii) la coalescencia o rotura de las burbujas por rotura de la película interfacial que las forma. La concurrencia de estos fenómenos acaba con la destrucción final de la espuma y la separación irreversible de fases. La estabilidad es una propiedad fundamental de las espumas alimentarias, puesto que la percepción de calidad por parte del consumidor está afectada por la apariencia.

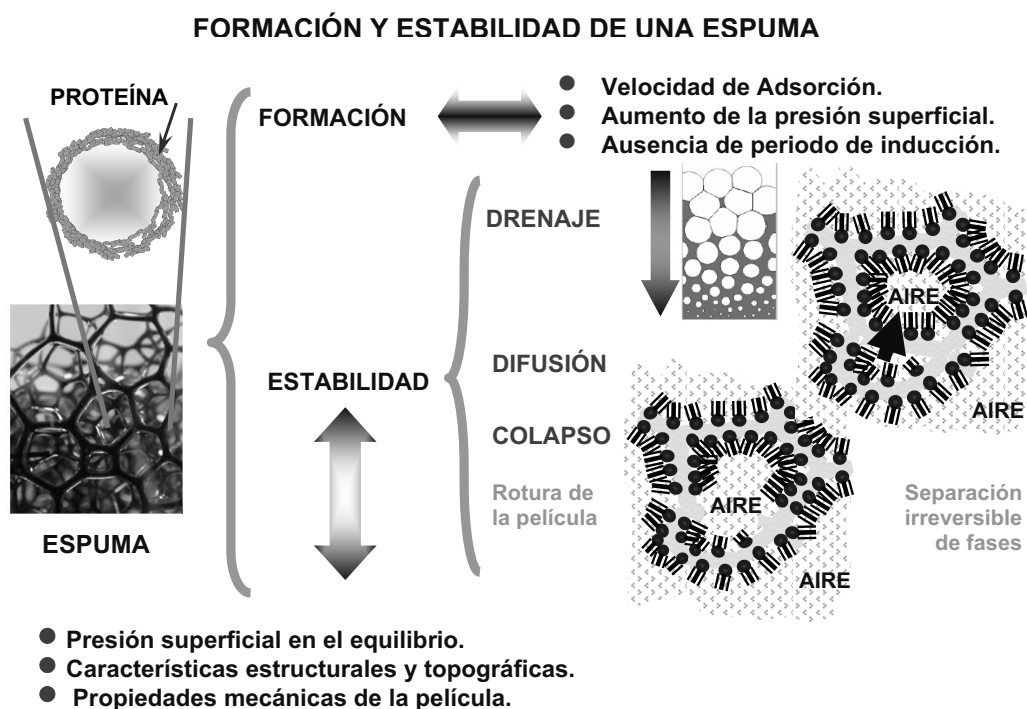


Figura 5. Influencia de las propiedades de la película superficial sobre la formación y estabilización de una espuma.

3.1. Formación de la espuma.

La formación de una espuma y su estabilidad depende de distintas propiedades interfaciales del agente espumante (proteína) añadido a la formulación para tal fin, tales como la velocidad de adsorción sobre la interfase aire-agua y su capacidad de formar una película con unas propiedades mecánicas adecuadas para impedir su inmediata rotura (Figura 5).

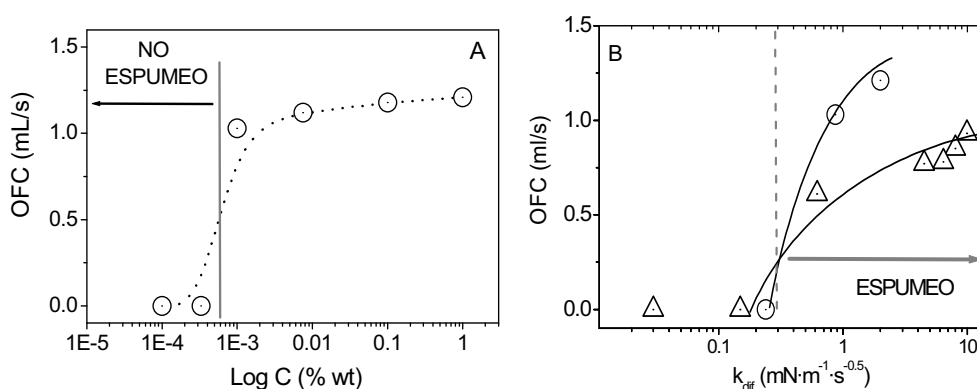


Figura 6. Evolución de la capacidad global de espumeo (OFC) con (A) la concentración de proteína en disolución y (B) la velocidad de difusión hacia la interfase aire-agua (k_{diff}). Símbolos (○) caseinato y (△) β-lactoglobulina. Gas de burbujeo: nitrógeno. Flujo de gas: 60 ml/s. Temperatura 20 °C, pH = 7, y fuerza iónica 0.05 M.

Como ejemplos, en la Figura 6 se muestran los efectos que sobre la capacidad global de espumeo (OFC) de proteínas lácteas ejercen su concentración en disolución y su velocidad de difusión hacia la interfase (k_{diff}) (Rodríguez Patino y col., 2008). El aumento de la velocidad de difusión de la proteína hacia la interfase va acompañado de una rápida formación de una película con unas propiedades mecánicas adecuadas para evitar la recoalescencia de las burbujas formadas y su destrucción prematura. Además, la formación de la espuma requiere la ausencia de un periodo de inducción (presente a bajas concentraciones de proteína).

3.2. Estabilización de la espuma.

La estabilización de la espuma frente a los diferentes mecanismos que propician su destrucción requiere el concurso de diferentes propiedades superficiales, tales como la presión superficial a tiempos prolongados de adsorción y las características estructurales, topográficas y mecánicas de la película del agente espumante adsorbido, de una forma complicada (Figura 5) (Rodríguez Patino y col., 2008).

Como ejemplo, en la Figura 7 se muestran los efectos que sobre los mecanismos individuales de inestabilidad de la espuma (de drenaje y difusión/colapso) ejercen la presión superficial en el equilibrio y el módulo dilatacional superficial a tiempos prolongados de adsorción (a los 180 minutos de adsorción) (Rodríguez Patino y col., 2008). La estabilidad de la espuma se favorece con aquellos factores que tienden a aumentar la cantidad de proteína adsorbida sobre la interfase aire-agua (cuantificada en la Figura 7A mediante el valor de la presión superficial en el equilibrio) y con la existencia de mayores interacciones entre las moléculas adsorbidas sobre la

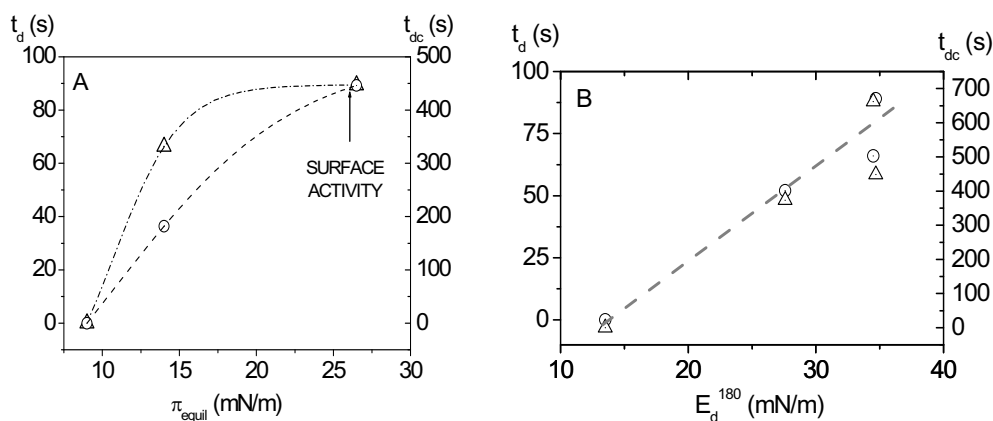


Figura 7. Evolución de los tiempos de drenaje (t_d : $\circ$) y de difusión/colapso (t_{dc} : $\triangle$) de la espuma con (A) la presión superficial en el equilibrio (π_{equil}) y (B) el módulo dilatacional superficial a 180 min de adsorción (E_d^{180}) para disoluciones acuosas de β -lactoglobulina. Temperatura 20 °C, pH = 7 y fuerza iónica 0.05 M.

interfase (cuantificada en la Figura 7B mediante el módulo dilatacional superficial a tiempos prolongados de adsorción).

4. Optimización del agente espumante y de la formulación.

Uno de los problemas que se presentan para la formación de dispersiones (emulsiones y espumas) cuando se utilizan proteínas en general y, especialmente, con el uso de proteínas vegetales, es que su funcionalidad se encuentra muy afectada por el pH (por su efecto sobre la solubilidad de la proteína) y fuerza iónica del medio (por su efecto sobre la agregación de la proteína). La funcionalidad óptima se consigue a pH muy ácidos o muy alcalinos, lo que limita su aplicación como ingredientes alimentarios en muchas formulaciones. En este apartado se discutirá el efecto de diferentes estrategias seguidas en el grupo de investigación, que combina la ingeniería de la formulación (analizando los efectos del cambio del pH o fuerza iónica del medio,

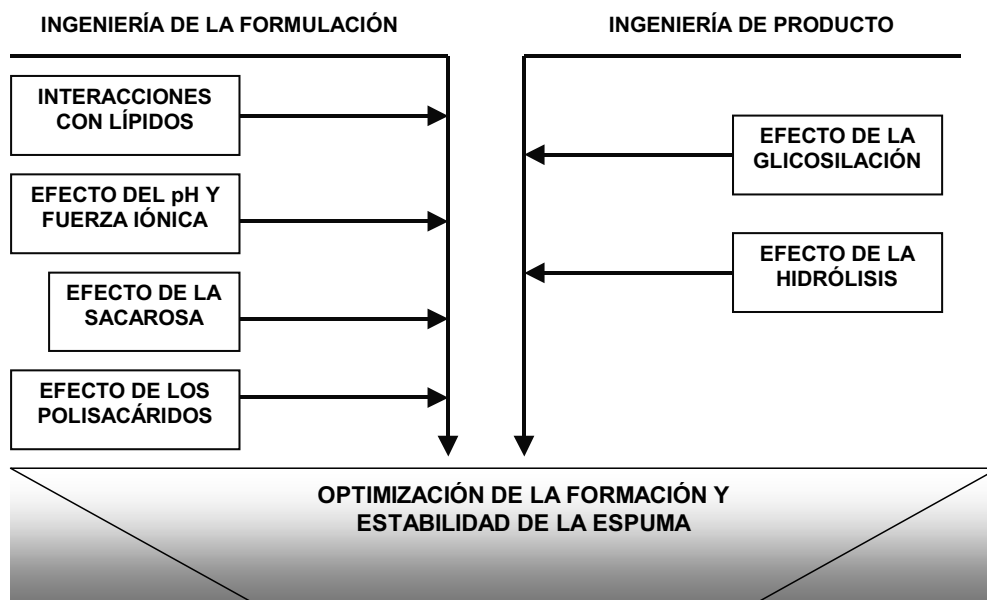


Figura 8. Optimización de la formación y de la estabilidad de una espuma formada a partir de una proteína mediante la aplicación de las modificaciones de la formulación de la proteína.

la adición de polisacáridos, sacarosa o de un tensioactivo) o la ingeniería de producto (analizando el efecto del tratamiento enzimático moderado o de la glicosilación) sobre las características interfaciales y espumantes de las proteínas en general (Figura 8).

Tiempo de inducción. El tiempo de inducción disminuye al aumentar la concentración de proteína en disolución, dependiendo del tipo de proteína. Por ejemplo, es mayor para la globulina de soja 11S que para la 7S, coincidiendo con la mayor masa molecular de la primera. También es mayor a pH 5 que a pH 7, coincidiendo con una mayor agregación de la proteína en disolución a $\text{pH} \approx \text{pl}$ de la proteína. Sin embargo, una fuerza iónica alta, la adición de sacarosa o de un tensioactivo (Tween 20), o un tratamiento enzimático moderado hace disminuir, o incluso hace desaparecer, el tiempo de inducción (Rodríguez Patino y col., 2008).

Velocidad de difusión. La cinética de difusión de la proteína hacia la interfase mejora al aumentar la fuerza iónica, con la adición de sacarosa o de un tensioactivo (Tween 20) a concentraciones superiores a su CMC y con la hidrólisis de la proteína, especialmente con disoluciones de proteína a $\text{pH} \approx \text{pl}$. Las mejoras de la cinética de adsorción de la proteína (ausencia de un periodo de inducción y mayor velocidad de difusión) van acompañadas de una mejora en las propiedades mecánicas de la película de proteína adsorbida sobre la interfase (Rodríguez Patino y col., 2008).

Características espumantes. Con relación a las características espumantes, se corrobora que la ausencia de un periodo de inducción, gracias al concurso de los factores analizados previamente, favorece la formación de espumas a partir de las disoluciones de proteínas. Cuando el periodo de inducción es del mismo orden de magnitud que el periodo de formación de la espuma esta no se produce, como se observa a $\text{pH} \approx \text{pl}$, a baja fuerza iónica, o en ausencia de hidrólisis de la proteína (Rodríguez Patino y col., 2008).

La estabilidad de las espumas suele ser mayor a $\text{pH} \neq \text{pI}$ porque en estas condiciones se incrementa la cantidad de proteína adsorbida sobre la interfase (aumenta la presión superficial) y la formación de una película elástica sobre la interfase. El tratamiento enzimático moderado también puede mejorar la estabilidad de las espumas a $\text{pH} \approx \text{pI}$, aunque ocurre lo contrario a $\text{pH} \neq \text{pI}$, porque los péptidos de menor tamaño producidos durante la hidrólisis tienen menor capacidad de formar una película viscoelástica sobre la interfase (Rodríguez Patino y col., 2008).

Hidrólisis enzimática. El efecto de la hidrólisis enzimática extensiva de las proteínas sobre las propiedades funcionales de las mismas (emulsificación o espumeo) es contradictoria, aunque estos hidrolizados puede ser utilizados para la formulación de determinados alimentos funcionales por su actividad biológica. Se ha comprobado (por ejemplo) que la hidrólisis extensiva de proteínas procedentes de un aislado de girasol produce un aumento significativo de la solubilidad, con relación al aislado de partida (Solanilla, 2009). Una buena solubilidad de la proteína es uno de los requisitos deseables para su uso en determinadas formulaciones que se presentan como bebidas. Pero, además, la solubilidad es también necesaria para el uso de estos productos como ingredientes de dispersiones alimentarias (espumas). En general, la velocidad de adsorción aumentan y las propiedades mecánicas de las películas adsorbidas mejoran con el aumento de la concentración de proteína en disolución. Por lo tanto, la reducción de las propiedades funcionales de los hidrolizados extensivos, debido al menor tamaño de los péptidos producidos, puede ser compensada al poder usarse mayores concentraciones de proteínas en disolución, por su mayor solubilidad, y que pueden entrar a formar parte de la película adsorbida sobre las partículas de la fase dispersa. Como consecuencia de la mejora de las propiedades interfaciales, la capacidad espumante y la estabilidad de las espumas formadas con estos hidrolizados extensivos también aumenta con su concentración en el medio acuoso.

Con relación a la actividad biológica de los hidrolizados extensivos de girasol se ha constatado que (Solanilla, 2009): (i) poseen una mayor actividad antioxidante que el aislado de partida y que esta actividad se mantiene en aproximadamente el 50% tras 120 minutos de incubación. Por lo tanto, estos hidrolizados extensivos podrían utilizarse como antioxidantes naturales, mejorando las propiedades antioxidantes de un alimento funcional y previniendo de la oxidación durante el procesamiento del alimento. (ii) Por otra parte, a partir de las medidas de actividad de inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina, se comprueba que estos hidrolizados poseen una actividad anti-hipertensiva, con valores crecientes del IC_{50} al aumentar el grado de hidrólisis. Por lo tanto, estos hidrolizados podrían ser utilizados en el desarrollo de alimentos funcionales con capacidad terapéutica.

En resumen, estos hidrolizados con actividad biológica y funcional demostrada, pueden ser usados directamente en la formulación de un alimento funcional presentado comercialmente como una dispersión sin que se requiera el concurso de un ingrediente adicional para su formación y estabilidad.

Adición de polisacáridos. El uso de determinados polisacáridos en combinación con las proteínas, pueden potenciar la funcionalidad de éstas a través de diferentes interacciones proteína-polisacárido, especialmente cuando la proteína se usa en medios adversos en cuanto al pH o la fuerza iónica, o cuando la proteína de partida está parcialmente degradada por tratamientos térmicos previos o durante la etapa de procesamiento (Dickinson, 2003b). Aunque los resultados obtenidos sobre las interacciones de proteínas lácteas y polisacáridos en disolución y sobre la interfase aire-agua y sus repercusiones sobre las características de las espumas se analizará en otros capítulos, en este apartado se mostrará a título de ejemplo el efecto de dos polisacáridos, que no muestran tendencia a adsorberse sobre la interfase aire-agua (alginato de sodio y lambda carragenina), sobre un concentrado de suero lácteo comercial (WPC) (Pérez y col., 2009a & b). Se ha observado que mientras que el WPC

no posee la capacidad de formación de espuma por sí mismo, posiblemente debido al tratamiento al que se ha sometido durante su producción, la adición de estos polisacáridos proporciona una capacidad de formación de espuma adecuada. Es decir, la capacidad espumante de disoluciones de WPC requiere la presencia de un polisacárido. La estabilidad de las espumas de WPC también mejora sensiblemente con la adición de un polisacárido y esta estabilidad aumenta con la concentración del mismo en disolución. Es decir, la concurrencia de proteínas y polisacáridos puede ser usada ventajosamente para optimizar la funcionalidad de la formulación. Esta optimización puede dirigirse a través de las características superficiales de las películas mixtas de estos biopolímeros.

Glicosilación de proteínas lácteas. Los resultados sobre las características interfaciales y espumantes de los conjugados de α -lactoglobulina y dextrano 10 y 20 kDa (D10 y D20), que han sido sometidos a una reacción de Maillard, ponen de manifiesto la incidencia de la glicosilación sobre las propiedades funcionales de la proteína (Solanilla, 2009). Estas propiedades funcionales dependen del tiempo de incubación a la temperatura de glicosilación, de la presencia del dextrano y a su vez de su peso molecular (D10 y D20) y, por último, del proceso de glicosilación y del contacto entre los biopolímeros. Se ha constatado que la glicosilación de la proteína tiene un efecto beneficioso sobre las propiedades interfaciales y espumantes cuando el pH de la disolución está próximo al pI de la proteína (a pH 5). No obstante, este efecto beneficioso desaparece o se invierte a $\text{pH} \neq \text{pI}$.

Conclusiones

La ingeniería de producto o de la formulación, que se fundamente en la correlación entre las propiedades específicas del producto, derivadas de su micro o nanoestructura, y la elección de las mejores condiciones de procesado, tiene relevancia para la formulación de dispersiones alimentarias (emulsiones y/o espumas). Es decir, los principios físico-químicos pueden mejorar la calidad y comportamiento de productos de elevado valor añadido a través de la adecuada correlación entre las propiedades del producto y su funcionalidad.

En este capítulo se ha mostrado que las propiedades termodinámicas y dinámicas de las películas de proteínas adsorbidas sobre la interfase aire-agua tienen un efecto significativo sobre la formación y estabilidad de espumas modelos de formulaciones alimentarias, en particular, y de dispersiones alimentarias reales (emulsiones y espumas), en general. Sin embargo, la aplicación de la ingeniería de la formulación o de producto a la formulación de dispersiones alimentarias requiere la concurrencia de diferentes áreas de investigación que incluye a la biotecnología, nanotecnología, nutrición, salud, etc., con el fin de obtener las aplicaciones óptimas de estos agentes espumantes y emulsionantes en formulaciones tradicionales y nuevas formulaciones. Es decir, la producción moderna de productos alimentarios tiene que ser necesariamente multidisciplinar.

Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada a través de CYTED (proyecto A.1.2), CICYT (proyecto AGL2007-60045) y Consejería de Educación y Ciencia, Junta de Andalucía (proyecto PO6-AGR-01535).

Referencias

- Aksenenko, E. V., Kovalchuk, V. I., Fainerman, V. B., Miller, R. (2006). Surface dilatational rheology of mixed adsorption layers at liquid interfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 122, 57-66.
- Álvarez, J. M., Rodríguez Patino, J. M. (2006). Formulation engineering of food model foams containing diglycerol esters and β -lactoglobulin. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 45, 7510-7519.
- Campbell, G. M. & Mougeot, E. (1999). Creation and characterization of aerated food products. *Trends Food Sci. Technol.*, 10, 283-296.
- Campbell, G. M.; Webb, C.; Padiela, S. & Nirajan, K. (Eds.). (1989). *Bubbles in Food*, Eagan Press, St. Paul, MN.
- Dickinson, E. (1992). An introduction to Food Colloids. *Oxford University Press*, Oxford, UK.
- Dickinson, E. (2003a) Interfacial, emulsifying and foaming properties of milk proteins. In *Advanced Dairy Chemistry*; Vol.: 1 Proteins, parts A and B; Fox, P. F. & McSweeney, P., Eds. Kluwer Academic/Plenum Publishers: Dordrecht, Netherlands, pp. 1229-1260.
- Dickinson, E. (2003b). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 25-40.
- Dickinson, E. (2006). Interfacial particles in food emulsions and foams. In B. P. Binks & T. S. Horozov (Eds.), *Colloidal Particles at interfaces*, Cambridge, UK: Cambridge University Press, pp. 298-327.
- Foedeging, E. A., Luck, P. J., Davis, J. P. (2006). Factors determining the physical properties of protein foams. *Food Hydrocolloids*, 20, 284-292.
- Gunning, A. P.; Wilde, P. J.; Clark, D. C.; Morris, V. J., Parker, M. L.; Gunning, P. A. (1996). Atomic force microscopy of interfacial protein films. *J. Colloid Interface Sci.*, 183, 600-602.
- Horne, D. S.; Rodríguez Patino, J. M. (2003). In *Biopolymers at Interfaces*; Malmsten, M., Ed.; Marcel Dekker: New York, p 857-900.
- Lucero, A. (2005). Propiedades Interfaciales de Emulsionantes Alimentarios. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- Mackie, A. R., Wilde, P. J. (2005). The role of interactions in defining the structure of mixed protein-surfactant interfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 117, 3-12.

- McClements, J. (2005). *Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques*, 2nd. Ed. CRC Press: Boca Raton, FL.
- Miller, R., Fainerman, V. B., Leser, M. E., Michel, M. (2004). Kinetics of adsorption of proteins and surfactants. *Curr. Opin. Colloid Int. Sci.*, 9, 350-36.
- Pérez, A.; Carrera, C. R.; Carrera, C., Santiago, L. G.; Rodríguez Patino, J. M. (2009a). Interfacial dynamic properties of whey protein concentrate/polysaccharide mixtures at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, 23, 1253-1262.
- Pérez, A.; Carrera, C. R.; Carrera, C., Santiago, L. G.; Rodríguez Patino, J. M. (2009b). Interfacial and foaming characteristics of milk whey protein and polysaccharide mixed systems. Enviado.
- Pizones, V., Carrera C., Rodríguez Patino, J. M. (2007b). Formulation engineering can improve the interfacial and foaming properties of soy globulins. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 6339-6348.
- Pizones, V., Carrera C., Yust, M. M., Pedroche, J., Millán, F., Rodríguez Patino, J. M. (2007a). Limited enzymatic hydrolysis can improve the interfacial and foaming properties of soy globulins. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 1536-1545.
- Pizones, V.; Carrera, C.; Yust, M. M.; Pedroche, J. J., Millán, F. & Rodríguez Patino, J. M. (2007c). Interfacial and foaming characteristics of soy globulins as a function of pH and ionic strength. *Colloids & Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp.*, 309, 202-215.
- Rodríguez Niño, M. R.; Carrera, C.; Cejudo, M.; Rodríguez Patino, J. M. (2001). Protein and lipid films at equilibrium at the air-water interface. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 78, 873-879.
- Rodríguez Niño, M. R.; Carrera, C.; Pizones, V.; Rodríguez Patino, J. M. (2005). Milk and soy protein films at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 19, 417-428.
- Rodríguez Patino, J. M., Rodríguez Niño, M. A., Carrera, C. (2003). Protein-emulsifier interactions at the air-water interface. *Curr. Opin. Colloid Int. Sci.*, 8, 387-395.
- Rodríguez Patino, J. M., Rodríguez Niño, M. R., Carrera, C. (1999b). Structural and morphological characteristics of β -casein monolayers at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 13, 401-408.
- Rodríguez Patino, J. M.; Rodríguez Niño, M. R.; Carrera, C. (2007c). Physico-chemical properties of surfactant and protein films. *Curr. Opin. Colloid Int. Sci.*, 12, 187-195.
- Rodríguez Patino, J. M.; Rodríguez Niño, M. R.; Carrera, C. (2008). Implications of interfacial characteristics of food foaming agents in foam formulations. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 140, 95-113.

- Solanilla, L. F. (2009). Ingeniería de Productos en Sistemas Dispersos Formulados a Base de Proteínas e Hidrolizados Protéicos. Tesis Doctoral, Universidad Pablo de Olavide (Sevilla).
- Wilde, P. J., Mackie, A. R., Husband, F., Gunning, P., Morris, V. (2004). Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 108-109, 63-71.

Estrategias para mejorar la funcionalidad de concentrados de proteínas lácteas comerciales.

Adrián A. Perez, Liliana G. Santiago*

Grupo de Biocoloides, Instituto de Tecnología de Alimentos. Facultad de Ingeniería Química.

Universidad Nacional del Litoral. 1 de mayo 3250. (3000) Santa Fe. Argentina.

Tel.: 54-342-4571164.(int. 2602)

**e-mail:lsanti@fiq.unl.edu.ar*

1. Introducción

Existen, obviamente, muchas ventajas cuando se transforman subproductos de la industria alimentaria en productos con alto valor añadido a pesar de su elevado precio. El interés en alcanzar este objetivo ha conducido a desarrollar distintas estrategias que transformen el suero lácteo, subproducto de la industria quesera, en un producto de alto valor añadido. En este sentido, se han desarrollado procesos para transformar este residuo líquido en concentrados proteicos (WPC) (>70 %proteínas) y aislados proteicos (WPI) (>90% proteínas). Así, las proteínas de suero lácteo han encontrado aplicación como suplemento dietario, agente espesante, emulsificante y como agente estabilizador de espumas. Sin embargo, una limitación para el uso de proteínas del suero lácteo en formulaciones alimenticias es su sensibilidad a las condiciones del medio acuoso, tales como pH y fuerza iónica y a las condiciones de procesamiento como el tratamiento térmico, entre otras.

Por esta razón, una segunda estrategia, objeto de estudio durante los últimos años, ha sido la aplicación de tratamientos que permitan la modificación de las proteínas del suero para mejorar sus propiedades funcionales. Entre estos tratamientos cabe destacar la acidificación, el tratamiento térmico, la hidrólisis y el entrecruzamiento enzimático. Estos tratamientos pueden mejorar la capacidad de las proteínas de formar geles, mejorar la retención de agua o las propiedades espumantes y

emulsionantes (Dickinson, 1992; Blecker y col., 1997). Sin embargo, muchas de las modificaciones químicas de las proteínas pueden alterar su digestibilidad (Matoba y col., 1980) y no han encontrado aceptación en la industria elaboradora de WPC debido al aumento de costos, la utilización de productos químicos que precisan de un control de las reacciones y la necesidad de aprobación por parte de los entes reguladores y de los consumidores.

Por otro lado, una alternativa más sencilla para mejorar la funcionalidad de proteínas es a través de su interacción con polisacáridos. El uso de diferentes polisacáridos (alginatos, carrageninas, pectinas, etc.) como agentes estabilizantes en formulaciones alimenticias podría balancear e incluso promover la funcionalidad de las proteínas a través de diferentes interacciones entre biopolímeros (Syrbe y col., 1998; Dickinson, 2003). Las interacciones proteína-polisacárido son particularmente sensibles a las características estructurales de las macromoléculas involucradas y a las condiciones que modulan las fuerzas intermoleculares tales como el pH, composición iónica y temperatura. Generalmente, a pH por arriba del punto isoeléctrico de la proteína (pI), ocurre la incompatibilidad termodinámica entre ambos tipos de biopolímeros debido a interacciones electrostáticas repulsivas y diferentes afinidades hacia el solvente (Galazka y col., 1999; Dickinson, 2003; Ganzevles y col., 2006). La funcionalidad individual de cada componente podría mejorarse mediante interacciones moleculares con repercusiones en la estabilidad, textura y vida útil de muchos productos alimenticios (Dickinson, 2003).

Desde esta visión, las estrategias que se podrían aplicar aprovechando las propiedades de mezcla de estas macromoléculas y que podrían plantearse en la elaboración de una dispersión alimenticia serían dos:

1. Deshidratación de una disolución de un concentrado de proteínas de suero lácteo conjuntamente con una disolución de un polisacárido mediante atomización para la obtención de un aditivo funcional co-secado. La ventaja de esta estrategia

reside fundamentalmente en que se obtendría un producto altamente soluble, con un único tiempo de hidratación lo que reduciría los tiempos de procesos de los productos formulados con el mismo. Por otro lado, se aumenta el valor comercial del WPC, sin utilizar agentes químicos.

2. Mezclado de los ingredientes con los polvos de concentrados de proteínas de suero lácteo y polisacáridos previamente hidratados para la obtención del producto final. Se trata de una estrategia válida, de menor costo para la industria elaboradora de alimentos pero no agrega valor comercial al WPC. Por otro lado, presenta la desventaja que los polvos deshidratados de WPC y de polisacáridos tienen distintos tiempos de hidratación.

Nuestra hipótesis de trabajo fue considerar que la utilización combinada del concentrado proteico de lactosuero y polisacáridos permite incrementar la funcionalidad de estos ingredientes si es posible encontrar las condiciones de sinergia que los potencien.

En esta contribución se presentan, a manera de ejemplo, algunos de los resultados más relevantes que soportan nuestra hipótesis de trabajo. El polisacárido elegido fue lambda-carragenina debido a su amplia utilización como agente espesante y estabilizante de dispersiones coloidales alimenticias. La lambda-carragenina (λ -C) es un polisacárido superficialmente no activo de alto peso molecular (aproximadamente 1.000 KDa) normalmente extraído de algas rojas. Su estructura química consiste en un polímero de galactosa esterificado con tres grupos sulfatos por unidad de disacárido (Sharma, 1981). A pH neutro, está cargado negativamente debido a la ionización de los grupos sulfatos (Dickinson, 2003). En la literatura, existen varias evidencias acerca de la capacidad de las carrageninas para formar asociaciones macromoleculares híbridas con proteínas del suero incluso a valores de pH superiores al punto isoelectrico (pI) de las mismas (Galazka y col., 1999; Dickinson, 2003).

En contribuciones previas se abordó tanto el estudio reológico de mezclas de WPC y λ -C como del producto co-secado (Lizarraga y col., 2006) y también se estudio el efecto del pH, la concentración total de sólidos y la temperatura de calentamiento sobre el proceso de gelificación y de los parámetros texturales de los geles (Spahn y col., 2008). Teniendo en cuenta esta consideración, en primer lugar y, como ejemplo de la estrategia 1, se evaluaron las propiedades de emulsificación de un aditivo co-secado de WPC/ λ -C. En segundo lugar, se analizaron las propiedades de espumado de sistemas acuosos mixtos WPC/ λ -C como ejemplo de la estrategia 2.

2. Propiedades de emulsificación de un co-secado de WPC comercial y λ -C

Es conocido que las emulsiones son sistemas inestables y tienen una tendencia a desestabilizarse con el tiempo (Dickinson, 1992; Frieberg, 1997; Mc Clements, 1999). La inestabilidad termodinámica de las emulsiones resulta de dos características fisicoquímicas distintas. Primero el contacto entre gotas de aceite y agua es energéticamente desfavorable y segundo, la densidad de los aceites comerciales es, en general, menor que la del agua y, por lo tanto, las gotas de aceite tienden a ascender. Los mecanismos de desestabilización que se pueden manifestar son cremado, floculación, coalescencia, maduración de Ostwald e inversión de fases (Frieberg, 1997).

Formular una emulsión alimenticia cinéticamente estable dependerá a su vez, de la prevención, durante su elaboración, de los mecanismos de desestabilización. Por ejemplo, en el caso de reemplazar la tradicional mayonesa por una baja en calorías, es importante considerar que se necesita de la adición de un agente estabilizante, como por ejemplo un polisacárido (Tabbilo-Munizaga y Barbosa-Canovas, 2005).

Los polisacáridos se agregan generalmente para aumentar la viscosidad de la fase continua y prevenir el cremado. Sin embargo, la influencia de esta macromolécula no es directa y depende de las características propias del sistema (McClements, 2000).

Para analizar la potencialidad de la estrategia 1 y, de acuerdo a trabajos previos, (Santiago y col., 2005) se utilizó una mezcla de WPC comercial (Milkaut S.A., Frank, Argentina) y λ -C en relación 8:1 que se deshidrató en un atomizador en planta piloto. Se obtuvo un aditivo co-secado de WPC/ λ -C (CS) de 67,34 % p/p en proteína, de similar estabilidad térmica que las mezclas WPC/ λ -C y de mayor solubilidad que el WPC de partida (Lizarraga, 2007).

2.1. Tamaño de gotas de las emulsiones

Se prepararon emulsiones (o/w) en un homogeinizador Ultraturrax usando aceite comestible de girasol (ϕ : 50%) como fase dispersa mientras que la fase continua se formuló con WPC (0,37% p/p – 2,93% p/p prot.) o con el producto CS (0,5 % p/p- 4,0 % p/p sólidos totales) a la misma concentración de proteínas. Para evaluar el tamaño de las gotas de las emulsiones se seleccionó el $D_{4,3}$ el cual indica el volumen ocupado por las gotas, dado que la propiedad importante en este caso es la estabilidad a la separación (Robins, 2000b). El $D_{4,3}$ en función de la concentración de proteína para las emulsiones con WPC y CS se muestra en la Figura 1. Se observó una notable disminución del tamaño de partícula a medida que aumentó la concentración de WPC y de CS en la fase acuosa. Por otro lado, en el caso del WPC se obtuvieron distribuciones bimodales en todo el rango de concentración, mientras que para el co-secado las distribuciones pasaron de bimodales, a bajas concentraciones a mono-modales a altas concentraciones (resultados no mostrados). Probablemente, la distribución de tamaños disminuyó como resultado de un efecto combinado de la mayor viscosidad de la fase continua, de la mayor disponibilidad de

proteína y de la elevada concentración de gotas la que modificaría la tensión de corte ejercida por el fluido sobre las mismas.

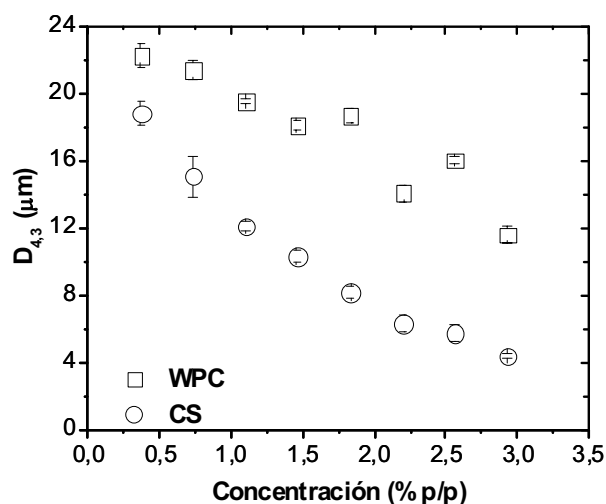


Figura 1: Efecto de la concentración sobre el valor de D (4,3) de emulsiones preparadas con WPC y CS. pH 6,5.

En el flujo estrictamente turbulento, la viscosidad de las fases no tiene ningún efecto sobre el tamaño de las gotas en el proceso de emulsificación. Sin embargo, estudios realizados con diferentes equipos homogeinizadores han mostrado que cuando la viscosidad de la fase continua se incrementa, la media disminuye. Esto implica un mecanismo de ruptura de las gotas que depende tanto de fuerzas inerciales como viscosas. Una mayor viscosidad disminuye el número de Reynolds lo que conduce a una turbulencia menos isotrópica, y así, a una mayor variedad de velocidades en los remolinos. Si la viscosidad se incrementa por la adición de un polímero hidrofílico, el resultado puede ser bastante diferente, al menos cuando la concentración de polímero no es demasiado baja y cuando la relación entre la longitud de elongación de la molécula polimérica, y el tamaño del remolino esta por arriba de cierto valor (Walstra, 1983; Flourey y col., 2002).

Otro factor a tener en cuenta al analizar la reducción del tamaño de las gotas en las emulsiones estudiadas, es la elevada concentración de las mismas por unidad de volumen. Este hecho podría haber contribuido a incrementar la tensión de corte ejercida por el fluido sobre cada gota y así, a una mayor reducción en su tamaño.

2.2. Estabilidad de las emulsiones

Cuando el único agente estabilizante de una emulsión es una proteína, la coalescencia es el mecanismo desestabilizante de menor velocidad frente al cremado y la floculación (Brittren y Giroux, 1991). Tomando en cuenta los tamaños relativamente grandes de las gotas (Figura 1) y la repulsión entre gotas debido a la capa proteica adsorbida, se consideró al cremado como el principal proceso de desestabilización de las emulsiones preparadas con WPC (Mc Clements, 1999). El análisis de la estabilidad de las emulsiones se evaluó a través de la evolución de los perfiles de reflectancia difusa o delta de retro-dispersión (ΔBS) de acuerdo a lo descrito por Mengual, y col. (1999a, 1999b). Estudios previos confirmaron que el cremado es el principal mecanismo desestabilizante para las emulsiones con WPC. Se pudo apreciar en todos los casos que, inicialmente, el registro de ΔBS fue constante a lo largo de toda la emulsión debido a que la distribución de gotas fue homogénea a través del sistema. A medida que las gotas se desplazan hacia arriba, debido a la gravedad, hay una disminución del ΔBS en la parte inferior de la emulsión, ya que la concentración de gotas disminuye (Lizarraga y col., 2008). Este comportamiento se halla soportado por la literatura de emulsiones (Carrera y Rodríguez Patino, 2005; Chanamai y Mc Clements, 2000a, 2000b; Robins, 2000b).

En las emulsiones con WPC a bajas concentraciones se observó un importante proceso de cremado que fue disminuyendo al aumentar la concentración de proteínas (Figura 2a). Este incremento en la estabilidad de las emulsiones sería debido

principalmente a la disminución del tamaño de partícula que se produjo al incrementar la concentración de WPC (Figura 1). La cinética de cremado indicó que en todas las concentraciones hubo inicialmente una separación muy rápida de las fases seguida de una etapa de separación más lenta. Se puede apreciar también que con el incremento de la concentración de proteína la velocidad de cremado de ambas etapas disminuyó.

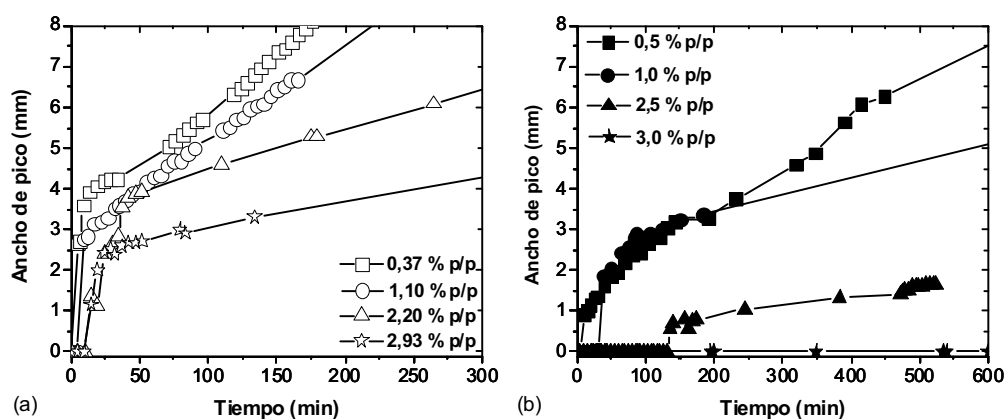


Figura 2: Cinética de cremado de emulsiones preparadas con WPC (0,36-2,93 % p/p prot.) (a) y CS (0,5-3,0 % p/p sólidos totales) (b). Turbiscan MA 2000. pH 6,5

La primera etapa de la cinética se produciría por el desplazamiento de las gotas más grandes que creman en primer lugar, mientras que la segunda etapa se debería al cremado de la población de gotas más pequeñas. A medida que se incrementa la concentración de proteína, el número de las gotas más grandes disminuye y aumenta el número de gotas más pequeñas (Lizarraga y col., 2008). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Robins y Hibberd (1998) para el perfil de cremado de una emulsión bidispersa. Por otro lado, en esta clase de emulsiones la fase crema puede alcanzar un grado de empaquetamiento mayor que en las emulsiones mono-dispersas.

La correlación entre velocidad de cremado y tamaño de partícula está regida por la ley de Stokes. Así, la velocidad de cremado estimada por esta ley fue mayor que la

reflejada por los datos experimentales. Considerando que el tamaño de partícula disminuyó aproximadamente un 50% entre la menor y la mayor concentración de proteína y que la viscosidad de la fase continua prácticamente se comporta como newtoniana y no varió mucho en el rango de concentraciones estudiado (Lizarraga y col., 2006), la ecuación de Stokes predice una disminución de la velocidad de cremado en seis veces. Sin embargo, los datos experimentales muestran una disminución de siete veces. Esta diferencia se explicaría por las limitaciones de la Ley de Stokes (estrictamente aplicable a sistemas mono-dispersos, de baja concentraciones de aceite, $\phi = 0,01$, y con gotas esféricas que no interactúen entre si). Así, en emulsiones concentradas, como las estudiadas, la velocidad final de las gotas al cremar será menor a lo predicho debido a las interacciones hidrodinámicas inter-gotas y al reflujo de la fase continua, opuesto al movimiento de las gotas durante el cremado (Robins y Hibberd, 1998; Manoj y col., 1998a, 1998b; Robins, 2000a). De los dos factores que influyen sobre la velocidad de cremado, en los sistemas estudiados predominan los efectos retardantes sobre los acelerantes.

En las emulsiones con CS (Figura 2 b) el proceso de cremado presentó visualmente una separación más nítida entre las fases crema y suero que en las emulsiones con WPC. Su desplazamiento hacia arriba se produjo en general en tres etapas: (i) inicialmente, no hubo movimiento (fase de retardo) (ii) pero luego la estructura subió hasta que alcanzó la fase crema y (iii) finalmente, la crema se fue compactando hasta transformarse en una capa uniforme y su fracción en volumen se fue incrementando hasta alcanzar ϕ_m (fracción máxima). Con el incremento de la concentración de CS disminuyó la velocidad de cremado en todos los casos y, se pudo observar que, a partir de una concentración de 1,0 % p/p, la emulsión presentó una pequeña etapa de retardo la cual se prolongó al aumentar la concentración. La mayor estabilidad frente al cremado observada en las emulsiones con CS se estaría produciendo, probablemente,

debido a la disminución en el tamaño de gotas (Figura 1) y al incremento en la viscosidad de la fase continua, variables que, analizando la ecuación de Stokes, disminuyen la velocidad de cremado. Estos resultados concuerdan con los de una emulsión de alta fracción en volumen, con una distribución de partículas poli-dispersas y que contienen un polímero en su fase continua (Robins, 2000a). La fase de retardo se produciría por la floculación de las gotas en presencia del polímero (floculación por exclusión de polímero) lo que generaría una estructura en red, también llamada gel particulado. Dado que eliminar el cremado es usualmente imposible, una forma de controlarlo sería a través del diseño de formulaciones que se encuentren en periodo de retarlo alargando la vida útil del producto (Robins y Hibberd, 1998; Manoj y col., 1998; Robins, 2000a; Santiago y col., 2002, Mc Clements, 2000).

2.3. Viscosidad de las emulsiones

La viscosidad de las emulsiones con WP y CS a distintas concentraciones de proteína se muestra en la Figura 3. Se puede apreciar que el comportamiento de las emulsiones con WPC fue prácticamente newtoniano para todo el rango de concentraciones estudiado y que, el aumento de la concentración de proteína apenas produjo incremento de la viscosidad.

Para el caso de las emulsiones con CS el modelo de Ley de Potencia ajustó adecuadamente a los datos experimentales (Tabla 1). Las emulsiones presentaron un cambio en el comportamiento de flujo de prácticamente newtoniano a pseudo-plástico con una ligera histéresis con el aumento de la concentración de CS. Comparando estas emulsiones con las de WPC, se encontró que la viscosidad se incrementó notablemente y surgieron comportamientos que previamente no habían sido observados a igual concentración proteica (Lizarraga y col., 2008).

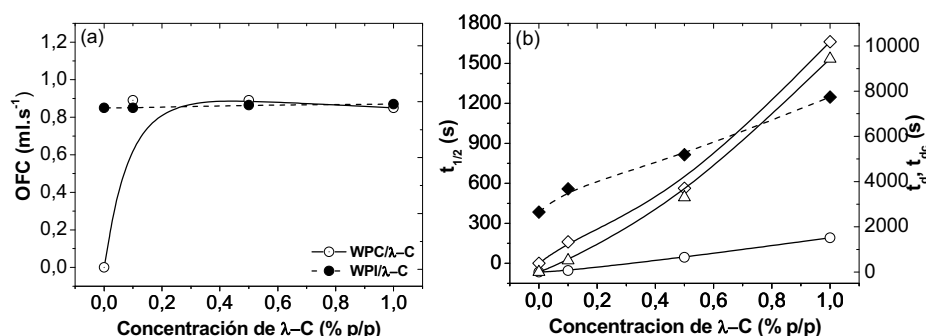


Figura 3: Efecto de la concentración sobre el comportamiento de flujo (viscosidad aparente, η_{ap} versus gradiente de velocidad, γ) de emulsiones preparadas con WPC (0,37-2,93 % p/p prot.) (a) y CS (0,5-4,0 % p/p sólidos totales) (b). Reómetro HAAKE RS600 con geometría plato-plato, temperatura 20 °C, pH 6,5.

El comportamiento reológico de las emulsiones con CS se ha relacionado, por un lado, con un incremento en la concentración de gotas por unidad de volumen, debido a que la fracción en volumen de aceite no se modificó y con la disminución del tamaño de partícula. Por otro lado, en sistemas estabilizados electrostáticamente, la fracción en volumen efectiva de las gotas más pequeñas es mayor que aquella de las gotas más grandes lo cual daría cuenta de una mayor viscosidad (Chanamai y McClements, 2000a). Además, la repulsión electrostática desempeñaría un papel importante en la reología de emulsiones concentradas, ya que las gotas eléctricamente cargadas no son capaces de aproximarse entre sí tanto como las gotas no cargadas, y consecuentemente no son capaces de ocupar los espacios vacíos que ocurren en la proximidad de las gotas vecinas (Chanamai y McClements, 2000a).

Tabla 1: Valores de viscosidad (η) según la ley de Newton y de los parámetros de la ley de potencia: $\eta=K\gamma^n$, donde K es el índice de consistencia, γ es el gradiente de velocidad y n es el índice de fluidez de las emulsiones preparadas con CS.

% (p/ p) ST	η	R^2	% (p/ p) ST	K	n	R^2
0,5	0,0319	0,9996	1,5	0,1406	0,8306	0,9999
1,0	0,0465	0,9990	4,0	1,2420	0,6623	0,9992

Por otro lado, el comportamiento pseudo-plástico y la histéresis se asocian usualmente a la presencia de estructuras (flóculos) que son total o parcialmente rotas con el incremento del gradiente de velocidad. En el caso de las emulsiones con CS, estos fenómenos se relacionan con estructuras débilmente floculadas que se van rompiendo generando el comportamiento pseudo-plástico (Tadros, 2004). Al evaluar la fase continua de las emulsiones, se encontró que las dispersiones de CS presentaron comportamiento newtoniano hasta una concentración de 3,0 % p/p y luego el mismo fue pseudo-plástico sin mostrar histéresis. Dado que la λ -C es una molécula de un tamaño considerablemente mayor que las proteínas del WPC, un factor a tener en cuenta al analizar la viscosidad de estas emulsiones es el efecto de concentración que sufre la fase continua al incorporar la fase aceite. Este efecto podría estar modificando el comportamiento reológico de la fase acuosa, correspondiendo al de una dispersión de mayor concentración de sólidos, lo cual también estaría contribuyendo al incremento en la viscosidad de la emulsión.

Finalmente, la utilización de esta estrategia permite obtener un producto cosecado con el cual se pueden diseñar emulsiones estables a través de la manipulación de los tiempos de retardo.

3. Propiedades espumantes de sistemas acuosos mixtos WPC comercial y λ -C

La formación y la estabilidad de una espuma dependen de las propiedades de los componentes superficialmente activos presentes en el sistema (Dickinson, 1992, 2003). La formación de una espuma está influenciada fundamentalmente por la adsorción de la proteína sobre la interfase aire-agua y por su capacidad de reducir la tensión superficial (Carrera y Rodríguez Patino, 2005; Rodríguez Patino y col., 2008). Este fenómeno provoca la formación de una película interfacial alrededor de las burbujas de gas. Por otro lado, la estabilización de una espuma contra el drenaje

(incluyendo el drenaje gravitacional y la regeneración marginal), desproporción (difusión de gas desde las burbujas más pequeñas hacia las más grandes) y coalescencia (ruptura de la burbuja de gas) requiere de la combinación de diferentes características mecánicas superficiales de la película adsorbida (Rodríguez Patino y col., 1997, 2008; Wilde, 2000; Dickinson, 2003). Así, el uso óptimo de las proteínas en la elaboración de una espuma depende del conocimiento de sus características fisicoquímicas, tales como la actividad superficial, viscoelasticidad superficial (bajo condiciones dilatacionales o de cizalla) y de la cinética de formación de la película a nivel de la interfase fluida. Obviamente, estas propiedades van a ser modificadas cuando en el sistema se cuenta con la presencia de otros ingredientes de la matriz, tales como los polisacáridos.

En este sentido, recientemente se han determinado las propiedades fisicoquímicas interfaciales de sistemas proteína-polisacárido en estudios modelos con el objeto de ser correlacionadas con las características de espumado (Baeza y col., 2005; Ganzevles y col., 2006). En general, estas propiedades dependen del carácter de las interacciones entre los biopolímeros tanto en el seno de solución acuosa (atracción o segregación) como en el entorno de la interfase aire-agua, de la naturaleza química (estructura química, actividad superficial) y de la concentración relativa de los componentes en el sistema. Estos estudios también revelaron como la interacción macromolecular entre proteínas y polisacáridos, influenciada por las condiciones del medio acuoso (pH, fuerza iónica, etc.), puede utilizarse para manipular el comportamiento de adsorción de estos biopolímeros a nivel de interfaces fluidas (Baeza y col., 2005; Ganzevles y col., 2006).

Sin embargo, debido a la complejidad de los mecanismos que intervienen durante la formación y estabilización de espumas en sistemas alimenticios se requieren más estudios en profundidad en los que se empleen materias primas comercialmente disponibles. Esta observación constituye la principal motivación de nuestro grupo de

trabajo la cual será reflejada como una segunda estrategia destinada al mejoramiento de la funcionalidad de proteínas del suero lácteo.

En esta segunda parte de la presente contribución se mostrarán los principales resultados obtenidos de un estudio acerca de las propiedades de espumado de sistemas acuosos mixtos WPC/ λ -C en relación a las características reológicas superficiales de las películas adsorbidas sobre la interfase aire-agua.

3.1. Formación y estabilidad de las espumas

Para comprobar la hipótesis que la funcionalidad del WPC podría mejorarse mediante su interacción molecular con λ -C, se partió de una muestra comercial de WPC (Arla Food, Porteña, Argentina) que, originalmente a concentración de 1 % p/p (concentración en el seno de solución que permitió la saturación de la interfase aire-agua), no produjo una espuma verdadera durante el ensayo, en un equipo de espumado por inyección de gas.

En las condiciones experimentales empleadas, se observó que la formación de la espuma de WPC estuvo acompañada por una rápida desestabilización, lo que impidió la determinación de los parámetros específicos de espumado. Sin embargo, en estudios previos, se encontró que el WPC fue capaz de adsorberse sobre la interfase aire-agua formando una película adsorbida con buenas propiedades mecánicas superficiales (Perez y col., 2008).

Por otro lado, en contraste con el WPC, la capacidad espumante de una solución acuosa de un WPI comercial (Davisco Ingredients) al 1 % p/p corroboró las excelentes propiedades de espumado de la β -lactoglobulina, principal componente del WPI (Álvarez y Rodríguez Patino, 2006; Rodríguez Patino y col., 2008). Así, el deterioro de la capacidad espumante de la muestra comercial de WPC podría ser relacionado directamente con su composición y/o con la agregación de la proteína debido a la

desnaturalización térmica durante su producción industrial (Perez y col., 2008). Sin embargo, como industrialmente ambas preparaciones comerciales de proteína están sujetas prácticamente al mismo tratamiento térmico, la principal diferencia en la funcionalidad podría deberse a la presencia del alto contenido de grasa en el WPC (Perez y col., 2008). En general, todos los tipos de lípidos, excepto los monoacilglicéridos, inciden negativamente en las características espumantes del WPC (Vaghela y Kilara, 1996). También se conoce que la eliminación de grasa (Vaghela y Kilara, 1996; Huffman y Harper, 1999) o la transformación de la grasa hidrofóbica original (triglicéridos) en mono y diacilglicéridos (entre otros componentes) por tratamiento enzimático (Blecker y col., 1997) mejora significativamente la capacidad espumante del WPC original. Por otro lado, la eliminación de las membranas de los glóbulos grasos de la leche como los componentes del complejo proteosapeptona mejora las propiedades espumantes del WPC (Zhu y Damodaran, 1994).

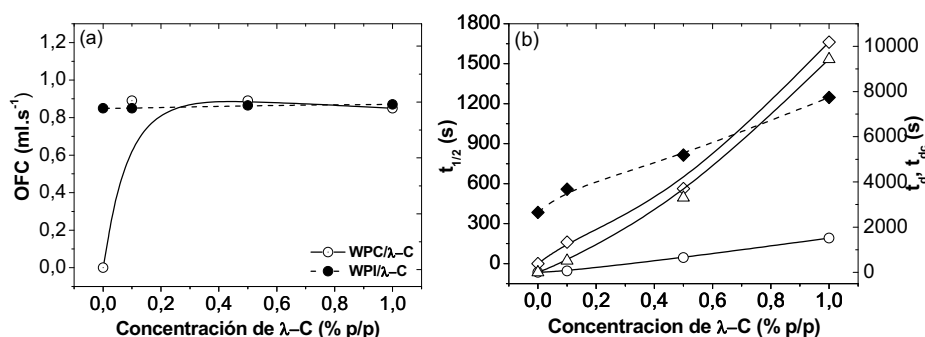


Figura 4: Efecto de la concentración de λ -C sobre la formación de espumas (determinada por la capacidad espumante global, OFC) de WPC y WPI (a), y sobre la estabilidad de espumas (determinada por el tiempo de vida media, $t_{1/2}$ ($\diamond$), y por los tiempos de relajación, t_d ($\triangle$) y t_{dc} ($\circ$), correspondientes a las cinéticas de drenaje/regeneración marginal y desproporción/colapso, respectivamente) de WPC. Se incluye como una referencia el $t_{1/2}$ para una espuma de WPI ($\blacklozenge$)(b). Concentración de proteína en la subfase acuosa: 1,0 % p/p, pH 7, I 0,05 M, temperatura 20 °C.

Otra estrategia para mejorar las propiedades de espumado del WPC, es la adición de pequeñas cantidades de λ -C. Existen trabajos previos que han confirmado que la

adición de polisacáridos a disoluciones acuosas de proteínas puede tener un efecto positivo sobre las propiedades espumantes (Makri y Doxastakis, 2007; Rodríguez Patino y col., 2008). Sin embargo, son muy pocos los estudios que relacionan el efecto sinérgico de las interacciones proteína-polisacárido sobre la formación y estabilidad de espumas con las características dinámicas superficiales de las películas adsorbidas.

El efecto de la concentración de λ -C (dentro del rango de 0-1 % p/p) sobre la capacidad espumante del WPC se muestra en la Figura 4a. Puede observarse que la adición de λ -C produjo un aumento significativo de la capacidad espumante global del WPC (OFC). Sin embargo, la adición de λ -C no produjo ningún cambio en la capacidad espumante del WPI. Como la concentración de WPI en la subfase acuosa (1,0 % p/p) fue suficiente para saturar la interfase aire-agua, y debido a sus excelentes propiedades espumantes, la adición de un polisacárido superficialmente no activo como la λ -C prácticamente, no provocó ningún cambio en la formación de las espumas. Estos resultados muestran que sería necesaria la adición de pequeñas cantidades de λ -C (0,1 % p/p) al WPC para producir el mismo valor de OFC que el WPI. Las propiedades dinámicas superficiales de las películas adsorbidas, fundamentalmente a cortos tiempos de adsorción podrían explicar, en parte, el efecto sinérgico observado sobre la capacidad espumante del WPC en presencia de λ -C (Perez y col., 2008).

Por otro lado, la estabilidad estática de las espumas de WPC/ λ -C, determinada por el tiempo de vida media, $t_{1/2}$, y la cinética de los procesos de desestabilización individuales correspondientes al drenaje gravitacional y regeneración marginal, t_d , y desproporción/colapso de espumas, t_{dc} , en función de la concentración de λ -C en el seno de solución se muestran en la Figura 4b. En esta figura también se incluye la evolución del tiempo de vida media con la concentración de polisacárido para los sistemas WPI/ λ -C.

Interesantemente, todos estos parámetros ($t_{1/2}$, t_d y t_{dc}) aumentaron con la concentración de λ -C, indicando la existencia de un importante efecto sinérgico sobre la estabilidad de las espumas de WPC, fundamentalmente a la mayor concentración de λ -C evaluada (1 % p/p). También cabe destacar que, aunque la adición de λ -C no tuvo efecto sobre la capacidad espumante del WPI, la estabilidad de sus espumas mejoró tras de la adición del polisacárido. El efecto estabilizante de los polisacáridos contra el drenaje gravitacional en espumas ha sido reportado con anterioridad en la bibliografía (Makri y Doxastaki, 2007).

El primer paso de inestabilidad sería debido al rápido drenaje del líquido incorporado a la espuma y/o al flujo de líquido desde la *lamella* hacia los bordes de *plateau* (regeneración marginal). Tras de este paso (o simultáneamente) tendría lugar el adelgazamiento de la película interfacial, promoviendo la difusión de gas a través de la *lamella* (desproporción). Finalmente la espuma colapsa como resultado de la ruptura de la *lamella* y de la coalescencia de las burbujas de gas.

En particular para los sistemas WPC/ λ -C, la velocidad de drenaje fue mucho más rápida que la velocidad de desproporción/colapso (Figura 4b). La velocidad de drenaje sería dependiente de la viscosidad de la fase acuosa continua, mientras que la velocidad de desproporción/colapso sería más dependiente de las características interfaciales de las películas adsorbidas.

El efecto de la adición de λ -C sobre las propiedades de espumado del WPC podría ser relacionado con las características dinámicas superficiales de las películas adsorbidas de los sistemas acuosos mixtos WPC/ λ -C.

3.2. Características dinámicas superficiales de las películas adsorbidas

La adsorción de una proteína sobre la interfase aire-agua puede determinarse mediante la medición de los cambios en la presión superficial con el tiempo.

Normalmente, el aumento de la presión superficial de la película adsorbida con el tiempo se relaciona con la adsorción de la proteína sobre la interfase aire-agua. Este fenómeno incluye: (i) la difusión de la proteína desde el seno de la solución acuosa hacia la interfase (el paso más importante para la formación de una espuma), (ii) la adsorción (penetración) y desplegamiento interfacial, (iii) agregación (reordenamiento) dentro de la película interfacial, formación de multicapas adsorbidas e incluso gelificación interfacial.

Por otro lado, la viscoelasticidad dilatacional superficial constituye un factor muy importante en lo que respecta a la estabilidad de espumas durante su etapa de producción. La reología superficial de las proteínas a nivel de la interfase aire-agua es de enorme interés no solamente debido a su importancia en relación a la estabilidad de la dispersión (Rodríguez Patino y col., 2008), si no también debido a su extrema sensibilidad a la naturaleza de las interacciones intermoleculares a nivel de las interfases (Rodríguez Patino y Rodríguez Niño, 1999).

El ángulo de fase (ϕ) entre el esfuerzo y la deformación dilatacional superficial puede considerarse como una medida de la viscoelasticidad relativa de una película de proteína adsorbida sobre la interfase aire-agua. Normalmente, durante la adsorción de una proteína, ϕ disminuye con el incremento del tiempo de adsorción, revelando la contribución de los mecanismos de adsorción (difusión, penetración y reordenamiento configuracional) a la viscoelasticidad relativa de una película interfacial (Miñones Conde y Rodríguez Patino, 2005). La relación entre ϕ y la presión superficial de las películas adsorbidas, π , para el WPC puro y para los sistemas WPC/ λ -C en función de la concentración de λ -C se muestra en la Figura 5a. En general, se observó un incremento en la elasticidad relativa de las películas adsorbidas a mayores valores de π . De las graficas ϕ - π podrían establecerse dos zonas de diferente elasticidad (Perez y col., 2008): (i) una zona de baja elasticidad (por arriba de la grafica ϕ - π del WPC puro)

y (ii) otra zona de alta elasticidad (por debajo de la gráfica $\phi-\pi$ del WPC puro). Así, los sistemas WPC/ λ -C serían clasificados considerando la concentración de λ -C en el seno de la solución acuosa. El incremento gradual en la concentración de λ -C produjo el desplazamiento de las curvas hacia regiones de alta elasticidad sugiriendo un mejor control de las propiedades viscoelásticas de las películas adsorbidas de WPC. Por otro lado, a baja concentración de polisacárido, se obtuvieron películas adsorbidas con una elasticidad similar a la elasticidad de la película de WPC puro. También se observó que la película adsorbida de WPI fue más elástica que la de WPC lo que confirmó la hipótesis acerca de los efectos de la presencia de impurezas en el WPC

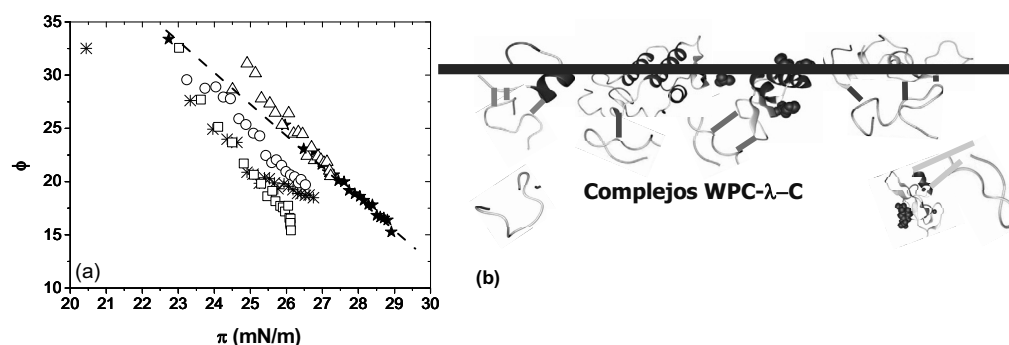


Figura 5: Efecto de la concentración de λ -C sobre la viscoelasticidad de la película adsorbida de WPC (representada por la gráfica $\phi-\pi$) sobre la interfase aire-agua. La gráfica $\phi-\pi$ para la película adsorbida de WPI se incluye como referencia. (★) WPC, (Δ) WPC:0,1 λ -C, ($\circ$) WPC:0,5 λ -C, ($\square$) WPC:1,0 λ -C, (*) WPI. Concentración de proteína en la subfase acuosa: 1,0 % p/p, pH 7, I 0,05 M. (a). Representación esquemática del fenómeno que ocurre durante la adsorción del WPC sobre la interfase aire-agua en presencia de λ -C en el seno de la solución acuosa (b).

En los sistemas mixtos WPC/ λ -C interacciones atractivas entre el WPC y λ -C podrían inducir la formación de entidades macromoleculares híbridas en el entorno de la interfase aire-agua (Figura 5b), generando una elevada estructuración interfacial y una mayor elasticidad de la película adsorbida de WPC. Estos resultados confirman que existe una buena relación entre la estabilidad de espumas y las propiedades dinámicas superficiales de las películas adsorbidas de WPC/ λ -C.

Conclusiones

Los resultados de esta contribución demostraron que es posible potenciar la funcionalidad de muestras comerciales de WPC a través de las estrategias tecnológicas planteadas. La adición de λ -C al WPC tanto en sistemas mezcla como en sistemas co-secados permitió la mejora de la formación y estabilidad de sistemas coloidales dispersos. El efecto sinérgico encontrado se basó en la capacidad de este polisacárido de: (i) aumentar la viscosidad de la fase continua, (ii) producir tiempos de retardo en el cremado de emulsiones debido a mecanismos de floculación por depleción y (iii) controlar las propiedades reológicas superficiales de películas adsorbidas de WPC mediante interacciones proteína-polisacárido en el entorno de interfases fluidas. El conocimiento y la manipulación de los factores que gobiernan las interacciones entre biopolímeros en un sistema coloidal alimenticio no sólo puede permitir la optimización de materias primas con baja funcionalidad, sino que también permitiría el desarrollo de nuevas funcionalidades para estos sistemas con diversas aplicaciones nanobiotecnológicas.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Proyecto UNL-ANCYPT PICTO 2005 N° 36237, al Proyecto Cyted 105PI0274 el que permitió las colaboraciones con el Dr. Juan Miguel Rodríguez Patino y Dr. Cecilio Carrera Sánchez del Grupo de Ciencia y Tecnología de Sistemas Dispersos, Dpto. de Química, Universidad de Sevilla, España, y al Proyecto UNL-ANCYPT PICTO 2005 N° 352831 el que permitió las colaboraciones con la Dra. Amelia C. Rubiolo del Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral. También se agradece especialmente al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET) por otorgamiento de una beca de postgrado al Lic. Adrián A. Perez.

Referencias

- Álvarez, J. M., Rodríguez Patino, J. M. (2006). Formulation engineering of food model foams containing diglycerol esters and β -lactoglobulin. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 45, 7510–7519.
- Baeza, R. I., Carrera, C., Pilosof, A. M. R., Rodríguez Patino, J. M. (2005). Interactions of polysaccharides with β -lactoglobulin adsorbed films at the air–water interface. *Food Hydrocolloids*, 19, 239–248.
- Blecker, C., Paquot, M., Lamberti, I., Sensidone, A., Lognay, G., Deroanne, C. (1997). Improved emulsifying and foaming of whey proteins after enzymatic fat hydrolysis. *Journal of Food Science*, 61, 48-52.
- Brittten, M., Giroux, H. J. (1991). Coalescence index of protein stabilized emulsions. *Journal of Food Science*, 56, 792-795.
- Carrera, C., Rodríguez Patino, J. M. (2005). Interfacial, foaming and emulsifying characteristics of sodium caseinate as influenced by protein concentration in solution. *Food Hydrocolloids*, 19, 407-416.
- Chanamai, R., McClements, D.J. (2000a). Dependence of creaming and rheology of monodisperse oil-in-water emulsions on droplet size and concentration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 172, 1-3, 79-86.
- Chanamai, R., McClements, D.J. (2000b). Creaming Stability of Flocculated Monodisperse Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 225, 214-218.
- Dickinson, E. (1992). *Introduction to food colloids*. Oxford: Oxford University Press.
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 25–40.
- Floury, J., Desrumaux, A., Legrand, J. (2002). Effects of ultra-high-pressure homogenization on structure on rheological properties of soy protein-stabilized emulsions. *Journal of Food Science*, 67(9), 3388-3395.
- Friberg, S. (1997). Emulsion stability. In S. Friberg & K. Larsson, *Food emulsions* (3). (p.1).New York: Marcel Dekker.
- Galazka, V. B., Smith, D., Ledward, D. A., Dickinson, E. (1999). Complexes of bovine serum albumin with sulphated polysaccharides effects of pH, ionic strength and high pressure treatment. *Food Chemistry*, 64, 303-310.
- Ganzevles, R. A., Cohen Stuart, M. A., van Vliet, T., de Jongh, H. H. J. (2006). Use of polysaccharides to control protein adsorption to the air–water interface. *Food Hydrocolloids*, 20(6), 872-878.

- Huffman, L. M., Harper, J. M. (1999). Maximizing the value of milk through separation technologies. *Journal of Dairy Science*, 82, 2238-2244.
- Lizarraga, M.S., De Piante Vicin, D., González, R., Rubiolo, A.; Santiago, L.G. (2006). Rheological behaviour of whey protein concentrate and lambda-carrageenan aqueous mixtures. *Food Hydrocolloids*, 20, 740-748.
- Lizarraga, M. S. (2007). Tesis de Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Estudio de los efectos del agregado de λ -carragenina sobre la estabilidad de emulsiones preparadas con concentrado de suero lácteo comercial. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral.
- Lizarraga, M.S., Pan, L.G., Añón, M.C., Santiago, L.G. (2008). Stability of concentrated emulsions measured by optical and rheological methods. Effect of processing conditions – I. Whey protein concentrates. *Food Hydrocolloids*, 22, 868-878.
- Makri, E. A., Doxastakis, G. I. (2007). Surface tension of Phaseolus vulgaris and coccineus proteins and effect of polysaccharides on their foaming properties. *Food Chemistry*, 101 (1), 37-48.
- Manoj, P., Fillery-Travis, A.J.; Watson, A.D., Hibberd, D.J.; Robins, M.M. (1998a). Characterization of depletion-flocculated polydisperse emulsion. I. Creaming behaviour. *Journal of Colloid and Interface Science*, 207, 283-293.
- Manoj, P., Watson, A.D., Hibberd, D.J., Fillery-Travis, A.J.; Robins, M.M. (1998b). Characterization of depletion-flocculated polydisperse emulsion. II. Steady-state rheological investigations. *Journal of Colloid and Interface Science*, 207, 294-302.
- Matoba, T., Doi, E., Yonezawa, D. (1980). Digestibility of acetylated and succinylated proteins by pepsin-pancreatin and some intracellular peptidases. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 2323-2328.
- McClements, D.J. (1999). *Food emulsions: principles, practice and techniques*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Mengual, O., Meunier, G.; Cayre, I., Puech, K.; Snabre, P. (1999). Characterisation of instability of concentrated dispersions by anew optical analyser: the TURBISCAN MA 1000. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152 111–123.
- Mengual, O., Meunier, G., Cayre, I., Puech, K., Snabre, P. (1999). TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurements for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*, 50, 445–456.

- Miñones Conde, J., Rodríguez Patino, J. M. (2005). Rheological properties of hydrolysates of proteins from extracted sunflower flour adsorbed at the air-water interface. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 44, 7761-7769.
- Perez, A. A., Carrara, C. R., Carrera, C., Santiago, L. G., Rodríguez Patino, J. M. (2008). Interfacial dynamic properties of whey protein concentrate/polysaccharide mixtures at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, 23, 1253-1262.
- Robbins, M.M., Hibberd, D.J. (1998). Emulsion flocculation and creaming. In *Modern Aspects of Emulsion Science*. Binks bP Cambridge: Royal Society of Chemistry (Ed.), 4, 115 – 144.
- Robins, M.M. (2000a). Emulsions -creaming phenomena. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5, 265-272.
- Robins, M.M. (2000b). Particle Size Analysis in Food. In R.A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 4130-4153.
- Rodríguez Patino, J. M., Rodríguez Niño, M. R., Álvarez, J. M. (1997). Interfacial and foaming characteristics of protein–lipid systems. *Food Hydrocolloids*, 11, 49–58.
- Rodríguez Patino, J. M., Rodríguez Niño, M. R. (1999). Interfacial characteristics of food emulsifiers (proteins and lipids) at the air-water interface. *Colloids & Surfaces B: Biointerfaces*, 15, 235-252.
- Rodríguez Patino, J. M., Carrera, C., Rodríguez Niño, M. R. (2008). Physico-chemical properties of surfactant and protein films. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12, 187-195.
- Santiago, L. G., Lizarraga, M. S., De Piante Vicin, D., González, R. J., Rubiolo, A. C. (2005). Efecto de la adición de λ -carragenina sobre las propiedades reológicas del concentrado proteico de suero lácteo. *Proteínas Alimentarias y Coloides de Interés Industrial*. Ed. Universidad de Sevilla, Sevilla, España. 179-186.
- Santiago, L.G., González, R.J., Fillery-Travis A., Robins, M., Bonaldo, A.G.; Carrara, C. (2002). The influence of xanthan and λ -carrageenan on the creaming and flocculation of an oil-in-water emulsion containing soy protein. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 19 (4), 411-417.
- Sharma, S. C. (1981). Gums and Hydrocolloids in oil-water emulsion. *Food Technology*, 41, 59-67.
- Spahn, G., Baeza, R., Santiago, L.G., Pilosof, A.M.R. (2008). Whey protein concentrate/ λ -carrageenan systems: Effect of processing parameters on the dynamics of gelation and gel properties. *Food Hydrocolloids*, 22, 1504-1512.

- Syrbe, A., Bauer, W. J., Klostermeyer, H. (1998). Polymer science concepts in dairy systems. An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. *International Dairy Journal*, 8, 179–193.
- Tadros, T. (2004). Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Advances in Colloids and Interface Science*, 108-109, 227-258.
- Tabbilo-Munizaga, G., Barbosa-Cánovas, G. (2005). Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 67, 147-156.
- Vaghela, M. N., Kilara, A. (1996). Foaming and emulsifying properties of whey protein concentrates as affected by lipid composition. *Journal of Food Science*, 61, 275-280.
- Walstra, P. (1983). Formation of emulsions. In P. Becher (Ed.), *Encyclopedia of emulsion technology*. Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 57-127.
- Wilde, P. J. (2000). Interfaces: Their role in foam and emulsion behaviour. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5, 76–181.
- Zhu, H. & Damodaran, S. (1994). Proteose peptones and physical factors affect foaming properties of whey protein isolate. *Journal of Food Science*, 59, 554-560.

Conservación de suero de queso por aplicación de antimicrobianos naturales.

von Staszewski, M.^{1,2}, Hernaez, L.¹, Mugliaroli, S.¹, Jagus, R.J.^{1,*}

¹*Laboratorio de Microbiología Industrial: Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería, Universidad de Buenos Aires. Pabellón de Industrias, Ciudad Universitaria, Buenos Aires (1428), Argentina.*

²- *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)*

Tel. 5411-4576 – 3240.

E-mail: rjagus@di.fcen.uba.ar

1. Introducción

La elaboración de queso da lugar a la producción de un volumen importante de suero, generándose, en promedio, en una relación de 9:1 respecto del queso (González-Martínez y col., 2002). Dada su composición, el suero representa un sustrato rico para el desarrollo de microorganismos contaminantes. Adicionalmente, las condiciones de elaboración del queso, permiten el desarrollo de microorganismos propios de la leche y de la contaminación ambiental. Como contrapartida, posee valor nutritivo que radica fundamentalmente en su composición, conteniendo más de la mitad de los sólidos de la leche utilizada para la elaboración del queso, incluyendo las proteínas (20% del total) y la mayor parte de la lactosa, además de minerales y vitaminas hidrosolubles (Atra y col., 2005).

El mercado de suero y productos derivados ha surgido a consecuencia de tres factores. El desarrollo de tecnología de separación por membrana y su integración a la industria láctea, ha posibilitado la separación, recuperación y concentración de valiosos ingredientes, como así también la creación de nuevos productos (Pouliet, 2008). Paralelamente, la importancia del cuidado del medio ambiente hizo necesario el

tratamiento del suero previo a su eliminación. El procesamiento del suero como efluente resulta antieconómico dada la gran inversión necesaria para la instalación de una planta de tratamiento, siendo ésta comparable a la inversión de una planta elaboradora de productos derivados (Peters, 2005). Finalmente, la fuerte demanda mundial de fuentes adicionales de proteínas, sumado al reconocimiento de la calidad de las proteínas del suero, promovió un cambio de actitud hacia el suero (Johnmson & Lucey, 2006), considerándolo un producto de gran valor nutritivo y funcional que puede ser procesado para la obtención de diferentes productos. Actualmente, en países con una industria láctea desarrollada, el suero es procesado obteniendo suero en polvo, concentrados (WPC) y aislados proteicos (WPI) para su utilización en alimentos para consumo humano y, en menor medida, en alimentación animal (Henning y col., 2006). La obtención de los derivados del suero requiere de una planta elaboradora que incluya un proceso de membrana, una concentración y un secado posterior, lo que implica una inversión considerable, siendo sólo aplicable a plantas que procesan más de 300.000 l/día de leche (Simón Leiva, 2003). Por lo tanto, es importante ofrecer alternativas de tratamientos para pequeñas y medianas empresas, desarrollando métodos simples y económicos que permitan estabilizar este efluente para que pueda ser almacenado hasta su utilización o traslado, manteniendo un estándar microbiológico y nutricional adecuado. Una opción interesante es utilizar directamente el líquido concentrado proveniente de la ultrafiltración, evitando el costo y el daño que pueda producir el secado. Para poder implementar esta alternativa es necesario desarrollar métodos de conservación de este producto intermedio.

En los últimos años, los consumidores han focalizado su interés en alimentos naturales, similares a los frescos, libres de aditivos químicos sintéticos, fáciles de consumir, estables y seguros. Esto ha impulsado un continuo desarrollo de nuevas tecnologías y barreras (“hurdles”) adicionales para satisfacer estas demandas. En este sentido ha aumentado el interés en las denominadas “tecnologías verdes”, incluyendo

los desarrollos de alimentos mínimamente procesados y los antimicrobianos naturales como alternativa al uso de los sintéticos (Gould, 1996; Deegan y col., 2006).

Los antimicrobianos producidos naturalmente son abundantes en el ambiente, encontrándose en animales, plantas y microorganismos; los mismos son generados como mecanismo de defensa del organismo productor. Estos compuestos han sido estudiados por su potencial aplicación como ingredientes naturales o aditivos alimentarios.

La nisina es una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*, y puede permeabilizar la membrana de los microorganismos ya que se une electrostáticamente a la carga negativa de los fosfolípidos de la membrana celular bacteriana aumentando su permeabilidad por formación de poros, resultando en un flujo de pequeñas moléculas intracelulares (Breukink y col., 1997). Adicionalmente interfiere con la biosíntesis de la pared celular. Este fenómeno está mediado por la habilidad de la nisina para unirse a una molécula de anclaje, el lípido II, un peptidoglicano precursor de la pared celular (Wiedermann y col., 2001; Bauer & Dicks, 2005). La nisina fue reconocida como preservante biológico seguro y legal en 1969 por el Comité Experto de Aditivos de Alimentos de FAO / WHO. En 1988 fue aprobada como aditivo de alimentos por la FDA (Food and Drug Administration, U.S.A.), y luego aceptada como un compuesto GRAS (Thomas y col., 2000). La nisina es efectiva en la inactivación de un amplio rango de bacterias gram positivas (Abee y col., 1995; Hill, 1998). Varios autores han demostrado su actividad en productos lácteos, como quesos untables, ricota, leche y suero líquido frente a la contaminación de bacterias gram positivas (Zapico y col., 1999; Gallo y col., 2007; Sobrino-López & Martín-Belloso, 2008; Arqués y col., 2008) y esporas resistentes a las altas temperaturas (Delves-Broughton, 1990).

Los productos MicrogardTM se obtienen mediante la fermentación de leche descremada o dextrosa por parte de *Propionbacterium shermanii*. Contienen diacetilo, ácido acético, propiónico y láctico y componentes inhibitorios de PM de 700 Da (Zuckerman

& Ben Abraham, 2002a). Son efectivos contra bacterias gram positivas (Lemay y col., 2002; von Staszewski y Jagus, 2008) y gram negativas como *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Yersinia* y algunos hongos (Al-Zoreky y col., 1991). Los productos Microgard™ fueron aprobados en los Estados Unidos por la Food and Drug Administration (FDA) para su uso en queso cottage y se estima que son utilizado en el 30% de los quesos producidos en ese país (Dave y col., 2003; Sani y col., 2005).

El té es la segunda bebida más consumida en el mundo, después del agua. Estudios epidemiológicos han mostrado que el consumo regular de té verde está asociado con beneficios para la salud humana, como por ejemplo la prevención de varios tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares. Estos efectos protectores son generalmente atribuidos a los polifenoles presentes en el té, en particular a las catequinas (Scalbert y col., 2005). Paralelamente, el té ha mostrado resultados alentadores respecto a su actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis* entre otros (Hamilton-Miller & Shah, 2000, Kim y col., 2004). Sin embargo, a pesar de la creciente utilización de los extractos de té verde en alimentos, la mayor parte de los experimentos reportados sobre su efectividad como antimicrobiano fueron realizados en medios de cultivo. Muy pocos estudios se han desarrollado directamente con matrices alimentarias, por lo tanto poco se sabe acerca de sus interacciones con los componentes de la misma.

La aplicación combinada de diferentes factores de preservación permite utilizar cada uno en concentraciones o intensidades menores que las requeridas en tratamientos individuales. La tecnología de barrera (hurdle) ilustra el efecto producido por la combinación de varios factores de preservación que hacen posible mejorar la estabilidad microbiológica y la calidad sensorial y nutricional, como también aspectos económicos del alimento al utilizar los recursos en forma más eficiente (Leistner, 2000).

Cabe destacar que algunos microorganismos patógenos y contaminantes pueden volverse más resistentes o más virulentos bajo condiciones de estrés. Sin embargo, les resultará más difícil sobrellevar el estrés impuesto si reciben simultáneamente diferentes factores que produzcan daños en múltiples blancos del microorganismo. Esta exposición simultánea de distintos tipos de estrés requerirá distintos mecanismos de resistencia que consumirán la energía celular, llevando al microorganismo a un agotamiento metabólico con consecuencias letales (Leistner, 2000).

Durante el procesamiento, preservación y almacenamiento de alimentos, los microorganismos son sometidos a varias condiciones de estrés inducidas por frío, calor, concentración salina ó presencia de ácidos, entre otros. Debido a esto es importante estudiar si los tratamientos aplicados en las materias primas afectarán la respuesta de los microorganismos contaminantes, frente a los estreses asociados al procesamiento posterior. Estos conocimientos permitirán desarrollar nuevas combinaciones de tratamientos que permitan controlar el crecimiento bacteriano y garantizar la seguridad de los alimentos (Faleiro y col., 2003, Lin & Chou, 2004).

2. Estabilización del suero líquido con antimicrobianos naturales

2.1. Tratamientos con nisina

Dadas las interacciones que la nisina presenta con distintos componentes de la matriz alimentaria, es importante investigar la efectividad de la misma en cada alimento en particular. Con este objetivo von Staszewski y col. (2006) y posteriormente Gallo y col. (2007) estudiaron la influencia de la concentración de sólidos y el pH en la respuesta de *L. innocua* frente al tratamiento de nisina (preparado a partir de Nisaplin®, Danisco, Copenhagen, Denmark) en suero líquido (preparado a partir de WPC34, Williner S.A). Observaron que la efectividad de la nisina disminuye conforme aumenta la concentración de sólidos del suero de 8% a 24% (Figura 1).

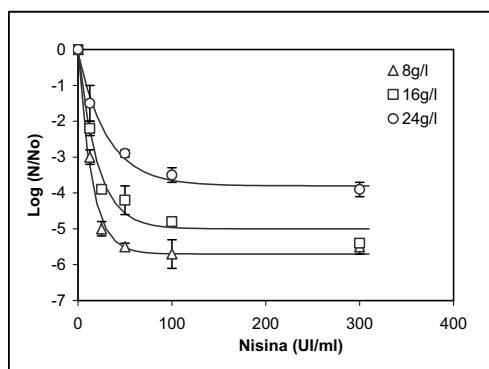


Figura 1: Inactivación de *L. innocua* por aplicación de nisina en suero líquido con distintas concentraciones de sólidos (pH 5,5). El inóculo inicial fue de 3×10^9 UFC/ml. Las líneas representan el ajuste no lineal de los datos experimentales a la ecuación de Gompertz.

Por otro lado, observaron que el tratamiento con 100 y 300UI/ml de nisina produjo una reducción inicial de 5 y 6 ciclos log, respectivamente, independientemente del pH del medio (rango de pH de 5,5 a 6,5). Resultados similares fueron obtenidos por Harris y col. (1991), quienes informaron que el agregado de nisina a la leche reduce la población de *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*. A su vez, Zapico y col. (1999) observaron que es posible alcanzar una reducción instantánea de 3,7 – 3,8 ciclos log de *L. innocua* en leche entera por la adición de 100UI/ml de nisina.

Varios estudios desarrollados en medios sintéticos, mostraron que la rápida reducción inicial de *L. monocytogenes* es seguida de una reanudación del crecimiento hasta alcanzar niveles similares a los obtenidos en el medio sin tratamiento (Shillinger y col., 1998; Shillinger y col., 2001). Por esta razón, Gallo y col. (2007) evaluaron también la efectividad de la nisina a distintos pH sobre *L. innocua* en suero líquido durante el almacenamiento a 20°C. Los resultados fueron modelados utilizando la ecuación de Gompertz (Cayre y col., 2003). En todos los casos se observó reanudación del crecimiento. La duración de la fase de latencia (DFL) y la densidad máxima poblacional (DMP) obtenidas a partir de esta ecuación, indican que la supervivencia de *L. innocua* en suero tratado con nisina depende ampliamente del pH del suero (Tabla 1).

Tabla 1: Parámetros derivados del modelo de Gompertz para el crecimiento de *L.innocua* a 20°C en CPSL en función del pH y la concentración de nisina (UI/ml). DFL (duración de la fase de latencia, horas); DMP (la densidad máxima de la población, Log (UFC/ml)).

	100 UI/ml Nisina			300 UI/ml Nisina		
	pH			pH		
	5,5	6	6,5	5,5	6	6,5
DMP	7,2	9,0	8,7	6,6	6,9	8,6
DFL	28,9	0,0	0,0	38,5	0,0	0,0

Cuando se combinó un tratamiento de 300UI/ml de nisina y pH 5,5 se obtuvo una fase de latencia (DFL) de 38 horas y una densidad máxima poblacional (DMP) 3 órdenes inferiores a la mostrada por el suero sin tratar. Estos autores estudiaron el origen del recrecimiento, llegando a la conclusión que las células de *L. innocua* tratadas con nisina en suero de queso desarrollaron resistencia a la bacteriocina. Estos resultados están en concordancia con el comportamiento de *L. monocytogenes* en caldo de cultivo observado por Chi-Zhang y col. (2004). El desarrollo de resistencia de *L. innocua* frente a la nisina ha sido atribuido a cambios en la membrana citoplasmática y pared celular del microorganismo (Crandall & Montville, 1998; Verehul y col., 1997). Colectivamente, estos resultados indican que es posible obtener una reducción importante de *L. innocua* en suero de queso por una combinación de nisina y pH reducido, almacenada a 20°C por 38 horas. Sin embargo, dado el recrecimiento producido, debido a células resistentes a la nisina, es necesario aplicar barreras adicionales. Por ejemplo, la reducción de temperatura a 7°C (100UI/ml de nisina y pH=5,5) produjo un cambio importante en la respuesta de *L. innocua*, llegando a valores no detectables en 48 horas, incrementando la posibilidad de almacenamiento del suero hasta 10 días sin que se observe recrecimiento (datos no mostrados). En concordancia con estos resultados, Robinson y col. (1998) observaron un pronunciado aumento en la fase de latencia de *L. monocytogenes* al bajar la temperatura de tratamiento de 15°C a 5°C.

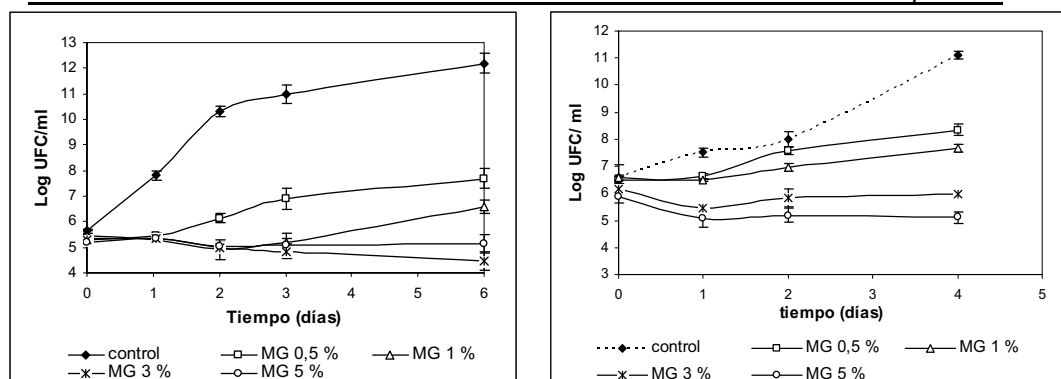


Figura 2: Efectividad de (a) MicrogardTM 300 sobre *Staphylococcus aureus* y (b) MicrogardTM 100 sobre *Salmonella typhimurium* en suero líquido almacenado a 20°C. Las barras de error indican la desviación estándar.

2.2 Tratamientos con MicrogardTM

Varios investigadores estudiaron la efectividad antimicrobiana de los productos MicrogardTM (Danisco, Copenhagen, Denmark) sobre microorganismos contaminantes del suero de queso. Mugliaroli y col. (2007) investigaron la efectividad de MicrogardTM300 frente a *Staphylococcus aureus* y MicrogardTM100 frente a *Salmonella typhimurium*. En ningún caso observaron reducción instantánea con las concentraciones de antimicrobiano evaluadas (0,5%; 1%; 3% y 5%), informando que concentraciones de 3% y 5% de MicrogardTM300 produjeron un efecto bacteriostático sobre *S. aureus* durante el almacenamiento a 20°C. Los tratamientos con concentraciones menores mostraron un leve crecimiento, mostrando en el caso de 1% una DMP 3 órdenes inferiores al control (Figura 2).

Otros autores obtuvieron resultados similares en la reducción de *S. aureus* presente en salmón fresco y pollo (Zuckerman & Ben Abraham, 2002a; Zuckerman & Ben Abraham, 2002b). Los resultados obtenidos para *S. typhimurium* fueron similares a los observados por Al-Zoreky y col. (1991) quienes evaluaron la efectividad de MicrogardTM100 frente a bacterias gram(-) en medio de cultivo, obteniendo inhibición de *S. typhimurium* en concentraciones superiores al 1%.

von Staszewski & Jagus (2008) también estudiaron la efectividad de Microgard™300 (5%) sobre *Listeria innocua* en suero líquido durante su almacenamiento a distintas temperaturas. El tratamiento no produjo una reducción instantánea significativa y mantuvo un comportamiento similar al suero sin tratar en todas las temperaturas evaluadas. La Figura 3 muestra el caso particular a 20°C.

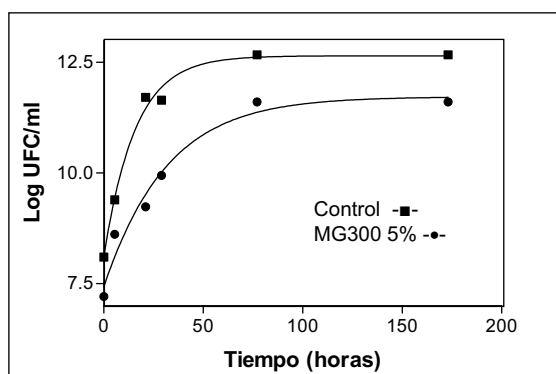


Figura 3: Efectividad de Microgard™ 300 (5%) sobre *Listeria innocua* en suero líquido almacenado a 20°C.

Como conclusión se obtiene que los productos Microgard™ son adecuados para su aplicación en la conservación de suero de queso frente a ciertos microorganismos como *S. aureus* y *S. typhimurium*. Sin embargo, 5% de Microgard™300 no es suficiente para retardar o inhibir el crecimiento de *L. innocua*.

2.3, Tratamientos con extractos de té verde

von Staszewski & Jagus (2007a) estudiaron el efecto antimicrobiano de distintas variedades de té verde argentino (CH112, CH410 y CH318) y té verde chino comercial frente a *Listeria innocua*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* en suero líquido durante el almacenamiento a 20°C. Estos autores determinaron previamente el contenido de polifenoles totales de cada una de las variedades estudiadas, aplicando el método de Folin-Ciocalteu (Slinkard & Singleton, 1977). El té verde comercial resultó tener menor cantidad de polifenoles que las otras variedades evaluadas (Figura 4). Estos valores se vieron correlacionados con la efectividad antimicrobiana de cada

variedad. Los diferentes microorganismos mostraron distintas sensibilidades con cada variedad y concentración durante el almacenamiento a 20°C.

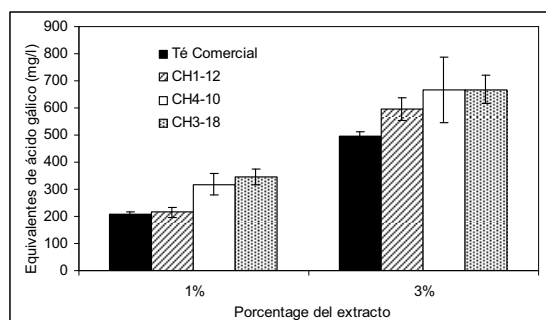


Figura 4: Contenido de polifenoles totales en extractos de té verde al 1% y al 3%.

En el caso de *S. typhimurium* se observó que los extractos al 1% no produjeron efectos inhibitorios del crecimiento a lo largo del almacenamiento, mostrando para todas las variedades un comportamiento similar al control (Figura 5a). Sin embargo, cuando se utilizaron los extractos al 3% se observaron diferentes comportamientos en el crecimiento de *S. typhimurium* frente a cada tratamiento, obteniéndose para las variedades CH 318 y CH 410 una fase de latencia de 24 horas aproximadamente y densidades máximas poblacionales de 3 y 4 órdenes inferiores al control (Figura 5b). La variedad CH112 y el té verde comercial mostraron un efecto inhibitorio leve, con una tasa de crecimiento inferior al control pero llegando a niveles similares a éste al finalizar el almacenamiento. Si y col. (2006) obtuvieron una inhibición para *S. typhimurium* del 58% utilizando un extracto comercial de té verde chino en una concentración de 500mg/l. A través de estudios con microscopía electrónica de barrido observaron que en presencia de té, las células aparecían formando cadenas o agregados, indicando que el tratamiento afecta la división celular. Dado que ninguno de los microorganismos evaluados pudo completar su división celular, estos autores sugieren que éste es el punto de ataque de los polifenoles del té.

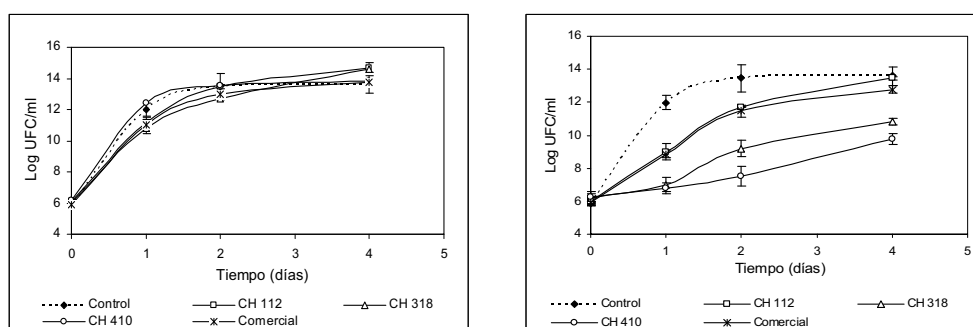


Figura 5: Efectividad de las distintas variedades de té verde sobre *Salmonella typhimurium* en suero de queso líquido. (a) Extractos al 1% y (b) extractos al 3%. Las barras de error indican la desviación estándar.

En el caso de *L. innocua*, von Staszewski & Jagus (2007a) también observaron que cuando el té se utilizó con una concentración de 1%, la actividad antimicrobiana correlacionó con el contenido de polifenoles (Figura 6a). Sin embargo, sólo las variedades con mayor contenido de polifenoles presentaron diferencias significativas con el control al finalizar el almacenamiento. Cuando el porcentaje del extracto se incrementó al 3%, la inhibición fue completa para todas las variedades evaluadas, mostrando *L. innocua* un comportamiento bacteriostático (Figura 6b).

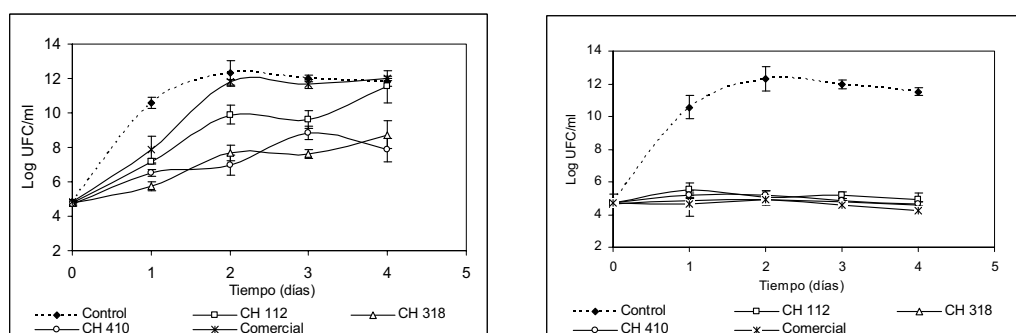


Figura 6: Efectividad de las distintas variedades de té verde sobre *Listeria innocua* en suero de queso líquido. (a) Extractos al 1% y (b) extractos al 3%. Las barras de error indican la desviación estándar.

S. aureus mostró ser el más sensible de los microorganismos evaluados. Los extractos al 1% inhibieron completamente su desarrollo, mientras que los extractos al 3%

mostraron además una disminución en el número inicial de microorganismos luego de 2 días de almacenamiento (Figura 7a y 7b).

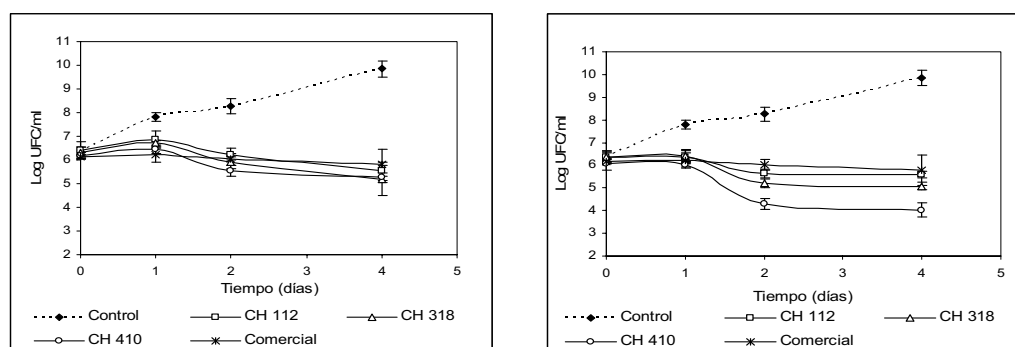


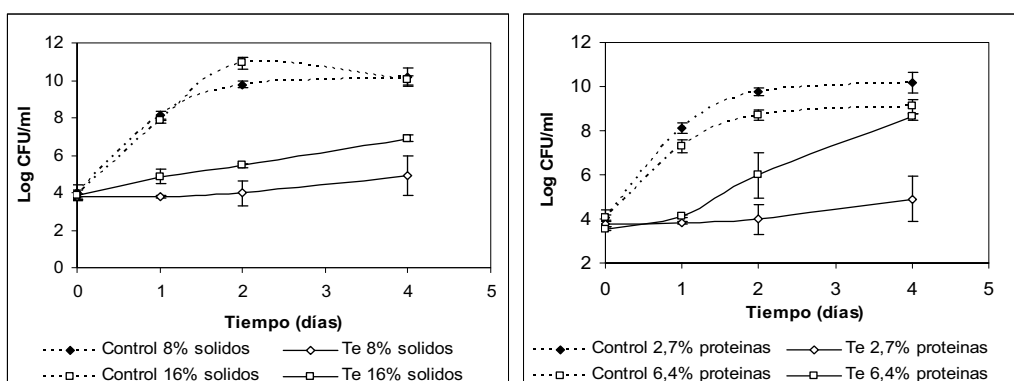
Figura 7: Efectividad de las distintas variedades de té verde sobre *Staphylococcus aureus* en suero de queso líquido. (a) Extractos al 1% y (b) extractos al 3%. Las barras de error indican la desviación estándar.

Las respuestas obtenidas para los distintos microorganismos son similares a las mostradas por otros autores (Si y col., 2006, Kim y col., 2004), quienes observaron que *S. aureus* es el más sensible al tratamiento con té verde, seguido por *L. monocytogenes*, siendo los más resistentes los gram(-) como *S. typhimurium* y *E. coli* 0157:H7.

Si bien los extractos de té verde fueron incorporados en muchos alimentos, no está lo suficientemente claro cuál es la interacción que éstos tienen con otros componentes del sistema. Por esta razón von Staszewski & Jagus (2007b) estudiaron la influencia del contenido de sólidos, contenido de proteínas y pH del suero en la efectividad del té verde como antimicrobiano sobre *Listeria innocua*. Este estudio se realizó con extracto de té verde al 3% y las muestras fueron almacenadas a 20°C. Los resultados obtenidos indicaron que el aumento de sólidos (de 8% a 16%) disminuyó la efectividad del té, obteniéndose una DMP de 2 órdenes menor para el caso de 8% de sólidos (Figura 8a). Cuando se evaluó el aumento de contenido de proteínas (de 2,7% a 6,4%), se observó un patrón similar, obteniéndose una diferencia de 3,7 ciclos log al

finalizar el almacenamiento (Figura 8b). Esto es coincidente con varios trabajos donde se muestra que existe una fuerte interacción de los compuestos fenólicos, responsables de la actividad antimicrobiana, con sistemas de proteínas y polisacáridos como leche y productos lácteos (Siebert y col. 1996; Ferruzzi & Green, 2006; He y col., 2006). Finalmente, contrariamente a lo observado con otros antimicrobianos naturales, el té verde presentó la misma efectividad en todo el rango de pH evaluado (pH 4 a 8), permitiendo su aplicación para un amplio grupo de alimentos (resultados no mostrados).

Figura 8: Efectividad del té verde (3%) sobre *Listeria innocua* en suero de queso líquido en función del contenido de sólidos (a) y en función del contenido de proteínas (b). Las barras de error indican la desviación estándar.



La aplicación de té verde como antimicrobiano es prometedora para la elaboración de alimentos saludables y seguros. Su utilización es adecuada para inhibir el crecimiento de microorganismos contaminantes en suero de queso. Sin embargo el potencial uso de polifenoles en alimentos lácteos en general y en suero de queso en particular, debe respaldarse con estudios sensoriales y organolépticos debido a que altas concentraciones de polifenoles pueden producir astringencia en el alimento (O'Connell & Fox, 2001).

2.4. Conservación de suero de queso por aplicación de tratamientos combinados

Algunos antimicrobianos poseen una baja efectividad en determinados alimentos debido a interacciones con los componentes del mismo. Por lo tanto resulta importante evaluar si es posible mejorar su respuesta en combinación con otros antimicrobianos u otros factores de stress.

von Staszewski & Jagus (2008) estudiaron la efectividad de la aplicación combinada de nisina (50, 100 y 200UI/ml) y Microgard™ 300 (5%), en concentrado proteico de suero líquido (8% de sólidos, pH=5,5), sobre *Listeria innocua*. A su vez evaluaron la respuesta de los tratamientos combinados durante el almacenamiento del suero a 7°C, 12°C, 20°C y 25°C. Observaron que la combinación de Microgard™ 300 y nisina es menos efectiva en la inactivación instantánea de *L. innocua* que el tratamiento individual de nisina. Mostraron que esta respuesta antagónica es independiente del sistema en el cual se aplica. La respuesta presentó una estrecha relación con la concentración de Microgard™ (Tabla 2). La efectividad del tratamiento disminuyó con el aumento de la concentración de Microgard™, indicando que la interacción de los antimicrobianos puede ser la razón principal del antagonismo en la reducción inicial.

Tabla 2: Influencia de las concentraciones de Microgard™ y nisina en la respuesta antagónica. Los datos están expresados como reducción (-Log N/No) de *Listeria innocua* (promedio ± DS) en suero de queso líquido.

MG 300 (%)	Nisina (IU mL ⁻¹)	
	50	200
0	4.2 ±0.5	6.8 ±0.2
1	1.4 ±0.4	4.3 ±0.2
5	0.5 ±0.2	2.2 ±0.3
10	0.0 ±0.2	1.5 ±0.4

Dado que el Microgard™ contiene ácidos orgánicos en su formulación se pueden comparar estos resultados con los obtenidos por Samelis y col. (2005), quienes encontraron un efecto antagónico en la reducción inicial de *L. monocytogenes* en

fiambre de cerdo cuando se utiliza nisina con ácido láctico o acético, componente presentes en los productos Microgard™. Sin embargo, al finalizar el almacenamiento a 20°C (Figura 9), el recuento bacteriano obtenido con el tratamiento combinado fue 3 ciclos logarítmicos menor que aquel obtenido con el tratamiento individual. Comportamientos similares fueron obtenidos a las otras temperaturas evaluadas. La excepción fue el almacenamiento a 7°C, donde, en el período evaluado, se observó mayor eficiencia en el tratamiento individual de 100UI/ml de nisina respecto a los tratamientos combinados. Resultados similares fueron mostrados por Zuckerman & Ben Abraham (2002b) para *L. monocytogenes* y aerobios totales en salmón fresco refrigerado frente a un tratamiento de nisina y Microgard™.

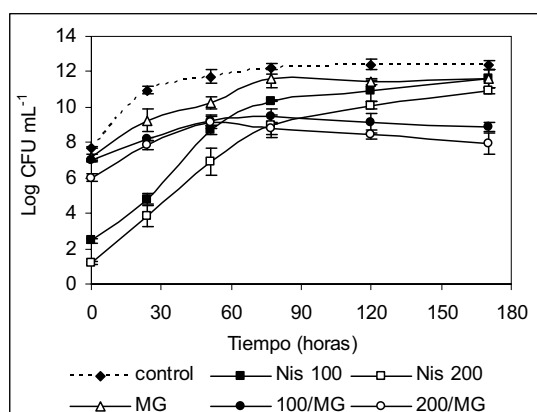


Figura 9: Efectividad de Microgard™ y nisina sobre *Listeria innocua* en suero de queso líquido. Las barras de error indican la desviación estándar.

Estos resultados mostraron la conveniencia de utilizar el tratamiento combinado de nisina y Microgard™300 para la inactivación de *Listeria innocua* en suero líquido. von Staszewski & Jagus (2008) sugieren que la inhibición a largo plazo puede ser atribuida fundamentalmente a la acción del Microgard™ 300. A su vez, nisina contribuyó a la reducción del número inicial de células y presumiblemente produjo daños celulares favoreciendo la prolongación de la fase de latencia.

Mugliaroli y col. (2007) estudiaron la combinación de nisina y Microgard™ sobre el desarrollo de *S. typhimurium* y *S. aureus* en suero líquido. Observaron que el

tratamiento combinado de los dos antimicrobianos mejoró la efectividad sobre *S. aureus* durante el almacenamiento a 20°C. Sin embargo, en el caso de *S. typhimurium* el agregado de nisina no mejoro la respuesta.

3. Efectividad de tratamientos de conservación en presencia de suero estabilizado.

Considerando que el suero estabilizado será utilizado como ingrediente en la formulación de alimentos, es importante conocer como afectará su incorporación en relación a la efectividad de los tratamientos que posteriormente serán utilizados en la elaboración y preservación de los mismos. La incorporación de antimicrobianos puede aumentar o disminuir la habilidad de los microorganismos presentes en tolerar estos tratamientos. Hernaez y col. (2007) estudiaron la respuesta de *Listeria innocua* frente a distintas condiciones de estrés como alta acidez, alta concentración salina, alta temperatura y presencia de H₂O₂ y etanol, después de la aplicación de antimicrobianos naturales en suero de queso líquido. Con este objetivo aplicaron los antimicrobianos durante 24 horas y luego expusieron sueros tratados y sin tratar frente a las distintas condiciones de estrés.

Estos autores observaron que cuando *Listeria innocua* se encontraba en suero tratado con nisina, mostraba mayor susceptibilidad a los tratamientos posteriores que cuando se exponía en un suero sin tratar (Tabla 3). El estrés de calor ó shock térmico (52°C, 60 minutos) produjo una reducción de 3 órdenes mayor con respecto al mismo estrés en las muestras control (suero sin nisina), resultando en un efecto sinérgico. Los tratamientos con NaCl (25%) y HCl (pH=3,8) también mostraron efectos sinérgicos con nisina, con reducciones de 4,0 y 4,2 ciclos log mayores que las muestras sin antimicrobiano. Los tratamientos más efectivos resultaron ser el etanol (18%) y el H₂O₂ (0,1%), con los cuales se obtuvieron recuentos menores a 50 UFC/ml. Se sabe que la nisina actúa formando poros por desestabilización de la membrana, produciendo flujo

de iones y solutos citoplasmáticos e inhibiendo procesos biosintéticos (Deegan y col., 2006). Este proceso sensibilizaría a la célula a cambios externos de osmolaridad y pH. Esta incapacidad de osmorregulación llevaría en estos casos a una mayor muerte celular.

Tabla 3: Respuesta de *Listeria innocua* frente a distintos estreses luego de la aplicación de nisina (300UI/ml), Microgard (5%) y té verde (3%). Los datos están expresados como reducción (-Log N/No).

	Control	calor	NaCl	Etanol	H ₂ O ₂	HCl
Sin antimicrob	0,0 ±0.2	0,6 ±0.4	0,3 ±0.1	0,3 ±0.4	4,1 ±0.2	0,1 ±0.1
Nisina	0,5 ±0.1	3,7 ±0.3	4,3 ±0.1	7,5 ±0.1	7,5 ±0.1	4,3 ±0.1
Microgard	0,2 ±0.2	3,9 ±0.2	0,2 ±0.3	0,8 ±0.2	4,5 ±0.4	0,2 ±0.3
Té verde	0,8 ±0.3	1,0 ±0.5	0,8 ±0.2	0,9 ±0.2	1,1 ±0.2	0,9 ±0.5

El tratamiento con Microgard™ ejerció un efecto sinérgico junto con la aplicación de calor, observándose una reducción de 2,3 ciclos log mayor con respecto al mismo estrés sin el agregado de Microgard™ (Tabla 3). Las condiciones de estrés inducidas con etanol, NaCl, H₂O₂ y HCl no mostraron diferencias significativas con respecto a las muestras sin antimicrobiano. Phan-Thanh y col. (2000) informaron que la adaptación de *Listeria monocytogenes* a un ambiente ácido producido con ácidos lipofílicos débiles (acético, butírico y propiónico), produce un aumento de resistencia al tratamiento posterior con calor (52°C), shock osmótico (25% NaCl) y estrés alcohólico (15%). Si bien Microgard™ tiene en su composición diacetilo, ácido acético, propiónico y láctico, la compleja matriz que posee el suero puede estar ejerciendo efectos protectores produciendo como consecuencia un comportamiento distinto.

Finalmente, el suero tratado con té mostró respuestas diferentes a las obtenidas con los otros antimicrobianos. Esto pudo deberse a que los polifenoles del té verde interactúan con la matriz alimentaria, principalmente con las proteínas, obteniéndose un sistema básicamente distinto, donde la respuesta bacteriana a los estreses posteriores se ve modificada. Adicionalmente, debido a la capacidad antioxidante del

té verde, el tratamiento con H₂O₂, el cual es altamente oxidante, resulta inefectivo, ejerciendo en este caso el té un efecto protector (Tabla 3).

Por lo tanto, Hernaez y col. (2007) concluyen que es posible obtener respuestas sinérgicas mediante la aplicación de antimicrobianos naturales en combinación con otros factores de estrés asociados al procesamiento y almacenamiento de alimentos. Sin embargo, resulta importante evaluar cada sistema alimenticio con el fin de optimizar las concentraciones a utilizar y estudiar posibles efectos protectores. La utilización de los antimicrobianos naturales nisina, MicrogardTM y té verde permitirían conservar el suero de queso para que pueda ser utilizado como ingrediente y en algunos casos aumentar la sensibilidad de *Listeria innocua* frente a tratamientos posteriores aplicados durante la elaboración y conservación de alimentos.

4. Perspectivas futuras

El suero de queso líquido estabilizado puede representar una alternativa económica a los concentrados y aislados proteicos del suero para su utilización en la elaboración de alimentos existentes o en nuevas formulaciones.

Los antimicrobianos naturales, solos o en combinación con otros factores de estrés, son promisorios para la conservación del suero líquido. Sin embargo, es necesario continuar con investigaciones que intensifiquen los estudios de los mecanismos de acción de los antimicrobianos frente a microorganismos contaminantes y patógenos como así también los mecanismos de las interacciones con otros antimicrobianos y la matriz alimentaria.

Referencias

- Abee, T., Krockel, L., Hill, C. (1995). Bacteriocins: mode of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology*, 28: 169-185.
- Al-Zoreky, N., Ayres, J.W., Sandine, W.E. (1991). Antimicrobial activity of MicrogardTM against food spoilage and pathogenic microorganisms. *Journal of Dairy Science*, 74: 758-763.
- Arqués, J.L., Rodríguez, E., Nuñez, M., Medina, M. (2008). Antimicrobial activity of nisin, reuterin, and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cuajada, a semisolid dairy product manufactured in Spain. *Journal of Dairy Science*, 91: 70-75.
- Atra, R., Vatai, G., Bekassy-Molnar, E., Balint, A. (2006). Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. *Journal of Food Engineering*, 67: 325-332.
- Bauer, R., Dicks, L.M.T. (2005) Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 101: 201-216.
- Breukink, E., van Kraaij, C., Demel, R. A., Siezen, R.J., Kuipers, O. P., de Kruijff, B. (1997). The C-terminal region of nisin is responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane. *Biochemistry*, 36: 6968-6976.
- Cayre, M. E., Vignolo, G., Garro, O. (2003). Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsions stored at three temperatures. *Food Microbiology*, 20: 561-566.
- Chi-Zhang, Y., Yam, K. L., Chikindas, M. L. (2004). Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into broth system. *International Journal of Food Microbiology*, 90: 15-22.
- Crandall, A. D., Montville, T. J. (1998). Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 231-237.
- Dave, R.I., Sharma, P., Julson, J. Muthukumarappan, K., Henning, D.R. (2003). Effectiveness of MicrogardTM in controlling *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Science and Technology*, 3: 262-266.
- Deegan, L., Cotter, P.D., Colin, H., Ross, P. (2006). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16: 1058-1071.
- Delves-Broughton, J. (1990). Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technology*, 44: 100-117.

- Faleiro, M. L., Andrew, P. W., Power, D. (2003). Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *International Journal of Food Microbiology*, 84: 207-216.
- Ferruzi, M.G., Green, R.J. (2006). Analysis of catechins from milk-tea beverages by enzyme assisted extraction followed by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 99: 484-491.
- Food and Drug Administration. (1998). Nisin preparation: Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. FDA, Federal Regulation, 53: 11247.
- Gallo, L.I., Pilosof, A.M.R., Jagus, R.J. (2007). Effective control of *Listeria innocua* by combination of nisin, pH and low temperature in liquid cheese whey. *Food Control*, 18: 1086-1092.
- González-Martínez, C., Becerra, M., Cháfer, M., Albors, A. Carot, J.M., Chiralt, A. (2002). Influence of substituting milk powder for whey powder on yoghurt quality. *Trends in Food Science and Technology*, 13: 334-240.
- Gould, G.W. (1996). Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *Journal of Food Protection*, (Suppl.): 82-86.
- Hamilton-Miller, J.M.T., Shah, S. (2000). Activity of the tea component epicatechin gallate and analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46: 847-863.
- Harris, L. J., Fleming, H. P., Klaenhammer, T. R. (1991). Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A, and UAL500 to nisin. *Journal of Food Protection*, 54: 836-840,
- He, Q., Shi, B., Yao, K. (2006). Interactions of gallotannins with proteins, amino acids, phospholipids and sugars. *Food Chemistry*, 95: 1178-1182.
- Henning, D.R., Baer, R.J., Hassan, A.N., Dave, R. (2006). Major Advances in Concentrated and Dry Milk Products, Cheese, and Milk Fat-Based Spreads. *Journal of Dairy Science*, 89: 1179-1188.
- Hernaez, L., von Staszewski, M., Jagus, R. J. (2007). Respuesta de *Listeria innocua* a distintos estreses luego de la aplicación de antimicrobianos naturales en suero de queso. *Alimentos, Ciencia e Ingeniería*, 16 (3): 222-224.
- Hill, C. (1998). Bacteriocins: natural antimicrobials from microorganisms. In G.W.Gould (ed.). *New methods of food preservation* (pp.22-39). Chapman and Hall, London.
- Johnson, M.E., Lucey, J.A. (2006). Major Technological Advances and Trends in cheese. *Journal of Dairy Science*, 89: 1174-1178.

- Kim, S., Ruengwilysup, C., Fung, D.Y.C. (2004). Antibacterial effect of water-soluble tea extracts on foodborne pathogens in laboratory medium and in food model. *Journal of Food Protection*, 67(11): 2608-2612.
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55:181–186.
- Lemay, M.J., Choquette, J., Delaquis, P.J., Gariépy, C., Rodrigue, N., Saucier, L. (2002). Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. *International Journal of Food Microbiology*, 78: 217-226.
- Lin, Y., Chou, C. (2004). Effect of heat shock on thermal tolerance and susceptibility of *Listeria monocytogenes* to other environmental stresses. *Food Microbiology*, 21: 605-610.
- Mugliaroli, S., von Staszewski, M., Jagus, R.J. (2007). Efecto combinado de antimicrobianos naturales sobre el desarrollo de *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium* en concentrado proteico de suero líquido (CPSL). En trabajos del XI Congreso CYTAL, Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Bs. As., Argentina. Área 17, Tomo: Tecnologías emergentes de preservación de alimentos, Trabajo N°: 04, 1ra. Edición, Bs. As., Argentina
- O'Connell, J.E., Fox, P.F. (2001). Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. *International Dairy Journal*, 11: 103-120.
- Phan-Than, L., Mahouin, F., Aligé S. (2000). Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 121-126.
- Pouliet, Y. (2008). Membrane processes in dairy technology- From a simple idea to worldwide panacea. *International Dairy Journal*, 18: 735-740.
- Peters, R.H. (2005). Economic aspects of cheese making as influenced by whey processing options. *International Dairy Journal*, 15: 537- 545.
- Robinson, T. P., Ocio, M. J., Kaloti, A., Mackey, B. M. (1998). The effect of growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 44: 83-92.
- Samelis, J., Bedie, G. K., Sofos, J. N., Belk, K. E., Scanga, J. A., & Smith, G. C. (2005). Combination of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4°C in vacuum packages. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 38: 21–28.

- Sani, A.M., Ehsani, M.R., Asadi, M.M. (2005). Effect of *Propionibacterium shermanii* metabolites on sensory properties and shelf life of UF-Feta cheese. *Nutrition & Food Science*, 35 (2): 88-94.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45: 287-306.
- Schillinger, U., Chung, H. S., Keppler, K., Holzapfel, W. H. (1998). Use of bacteriocinogenic lactic acid bacteria to inhibit spontaneous nisin-resistant mutants of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 657-663.
- Schillinger, U., Becker, B., Vignolo, G., Holzapfel, W. H. (2001). Efficacy of nisin in combination with protective cultures against *Listeria monocytogenes* Scott A in tofu. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 159-168.
- Si, W., Gong, J., Tsao, R., Kalab, M., Yang, R., Yin, Y. (2006). Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in chinese green tea extract. *Journal of Chromatography A*, 1125: 204-210.
- Siebert, K.J., Troukhanova, N.V., Lynn, P.Y. (1996). Nature of polyphenol-protein interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 80-85.
- Simón Leiva, D. (2003). Análisis técnico y económico de la conversión de una planta productora de leche en polvo en una planta productora de suero de quesería en polvo. Trabajo Profesional de Ingeniería Industrial, Facultad de Ingeniería, Universidad de Buenos Aires.
- Slinkar, K., Singleton, V.L. (1977). Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28: 49-55.
- Sobrino-López, A., Martín-Belloso, O. (2008). Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*, 18: 329-343.
- Thomas, L.V., Clarkson, M.R. y Delves-Broughton, J. (2000). Nisin. In Naidu, A.S., *Natural Food Antimicrobial Systems*. (pp.463-524). CRC Press, USA.
- Verheul, A., Russell, N.J., van't Hof, R., Rombouts, F.M., Abee, T. (1997). Modifications of membrane phospholipid composition in nisin resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3451-3457.
- von Staszewski, M., Parodi, M.F., Pilosof A.M.R., Jagus, R.J. (2006). Efecto combinado de antimicrobianos naturales sobre la inactivación y supervivencia de *Listeria innocua* en concentrado proteico de suero líquido. *Trabajo científico del V Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos (CIBIA V)*, México. Vol. II-43

- von Staszewski, M., Jagus, R. J. (2007a). Efecto antimicrobiano de distintas variedades de té verde argentino en suero de queso líquido. *Alimentos, Ciencia e Ingeniería*, 16 (3): 305-307.
- von Staszewski, M., Jagus, R.J. (2007b). Efectividad del té verde como antimicrobiano sobre *Listeria innocua* en suero de queso: influencia de las características del medio. En trabajos del XI Congreso CYTAL, Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Bs. AS., Argentina. Área 17, Tomo: *Tecnologías emergentes de preservación de alimentos*, Trabajo N°: 15, 1ra. Edición, Bs. As., Argentina.
- von Staszewski, M., R.J. Jagus (2008). Natural antimicrobials: effect of Microgard™ and nisin against *Listeria innocua* in liquid cheese whey. *International Dairy Journal*, 18: 255-259.
- Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., Kruijff B., Sahl, H.G. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 376: 1772-1779.
- Zapico, P., Medina, M., Gaya, P., Nuñez, M. (1999). The effect of homogenization of whole milk, skim milk and milk fat on nisin activity against *Listeria innocua*. *International Journal of Food Microbiology*, 46: 151-154.
- Zuckerman, H., Ben Avraham, R. (2002a). Quality improvement of Kosher Chilled Poultry. *Poultry Science*, 81: 1751-1757.
- Zuckerman, H., Ben Abraham, R. (2002b). Control of growth of *L. monocytogenes* in fresh salmon using Microgard™ and nisin. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 35: 543-548.

Enriquecimiento de productos lácteos con fibra: influencia sobre la microbiota iniciadora.

E. Sendra, E. Sayas-Barberá, J. Fernández-López, C. Navarro y J.A. Pérez-Alvarez

Grupo de Investigación IPOA (REVIV-Generalitat Valenciana y UMH-1). Departamento de Tecnología Agroalimentaria, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel km 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, España.

Tel.: 966749735

Fax: 966749677

E-mail: esther.sendra@umh.es

Resumen. El mercado de los productos lácteos funcionales ha experimentado un rápido crecimiento en los últimos años. Los productos lácteos enriquecidos con fibra, de frutas o de cereales, se encuentran entre los alimentos funcionales con mayor aceptación por parte de los consumidores. En este capítulo se presenta una revisión de los estudios publicados sobre el enriquecimiento con fibra de productos lácteos fermentados. Parte de los estudios se centran en establecer la dosis óptima de fibras que no perjudique a las características sensoriales, y otros en valorar el efecto de las fibras en la microbiota iniciadora. En general, la presencia de fibras no afecta al proceso de fermentación, pero sí mejora la supervivencia de las bacterias probióticas. La inulina, rafinosa, y fructoligosacáridos son beneficiosos para la viabilidad de bifidobacterias y lactobacilos; mientras que la lactulosa es solo beneficiosa para las bifidobacterias.

1. Introducción

Las evidencias científicas sobre la relación entre la dieta y la incidencia de determinadas enfermedades, principalmente la obesidad, los problemas cardiovasculares y el cáncer, han dado lugar a la aparición del mercado de los alimentos funcionales (Pérez-Alvarez y col., 2003). La industria láctea ha sido pionera, en incorporar determinados nutrientes y/o compuestos bioactivos, que ofrecen efectos saludables y reducen el riesgo de padecer determinadas enfermedades (Recio y López-Fandiño, 2005).

Existe una amplia gama de ingredientes funcionales pero entre ellos destaca, desde un punto de vista cuantitativo, la fibra dietética y algunos polisacáridos que representan el 50% de los ingredientes funcionales que se comercializan actualmente (Saura-Calixto y Goñi, 2005). Las fibras poseen propiedades nutricionales, tecnológicas y fisiológicas muy diferentes, según su estructura, composición y solubilidad, aspectos que determinan costes de producción, propiedades tecnológicas y características sensoriales del producto enriquecido (Saura-Calixto y Goñi, 2005).

Las leches fermentadas con bacterias probióticas (LFP) suponen el 43.7% de los ingresos del mercado de yogures en España, y suponen el 31.2% del volumen de ventas. El mercado de LFP está dominado por los yogures con bifidobacterias seguido por los que contienen *Lactobacillus casei*, y con menor incidencia *Lactobacillus acidophilus* (Durán, 2006a). Los yogures simbióticos son una nueva generación de productos lácteos en donde se combinan bacterias probióticas y uno o más oligosacáridos o fibras. La industria láctea, en particular los productores de yogures, están interesados en innovar y diversificar la variedad de productos funcionales (Durán, 2006b),

En la Unión Europea las nuevas regulaciones para el etiquetado de alimentos funcionales y etiquetado nutricional (1924/2006) exigen garantizar la veracidad de la información indicada en la etiqueta. Los efectos de las bacterias probióticas en el

tracto intestinal, dependen de su viabilidad y actividad metabólica, fomentados por la fermentación de los carbohidratos complejos y otros factores prebióticos (Silla Santos, 2003). No hay un acuerdo general en la concentración de microorganismos necesaria para ejercer efectos probióticos; generalmente se recomiendan recuentos entre 10^6 a 10^8 UFC/g (Lourens-Hatting y Viljeon, 2001). En Japón la Asociación de Leches Fermentadas y Bebidas Acidolácticas ha establecido un estándar que requiere recuentos superiores a 10^7 UFC/mL para publicitar que el producto contiene bacterias probióticas, en cambio la Agencia Suiza de Regulación Alimentaria y la Federación Internacional de Lechería requieren recuentos superiores a 10^6 UFC/mL.

2. La fibra como ingrediente funcional en productos lácteos

Actualmente, la fibra alimentaria o fibra dietética se define como el conjunto de polisacáridos y lignina que son resistentes a la hidrólisis de los enzimas digestivos del hombre. Esta definición engloba a las paredes celulares de los vegetales (celulosa, hemicelulosa, y lignina) y otros polisacáridos como las pectinas, las gomas y los mucílagos (Saura Calixto y Larrauri, 1996; Pedraza y Goñi, 1998).

No existe un método universal de estandarización para la determinación de fibra en los alimentos. Por su solubilidad en agua a 100°C y $\text{pH} = 6-7$, la fibra se divide en dos fracciones: fibra soluble y fibra insoluble, siendo cada una de ellas responsable de diferentes efectos fisiológicos. Esta división no es totalmente estricta, ya que la solubilidad de los distintos componentes puede variar en función de las propiedades físico-químicas del medio, y por tanto, del método de determinación utilizado (Hernández y col., 1995).

Las *fibras solubles* tienen influencia en los eventos del tubo digestivo, y se relacionan con su capacidad para retener el agua, formando soluciones viscosas de gran volumen cuando se encuentran en medio acuoso, que pueden provocar señales de

saciedad en el estómago, pudiéndose utilizar como coadyuvante en regímenes de adelgazamiento. Además, forman geles viscosos que pueden retener las moléculas de glucosa originadas en la digestión de los carbohidratos, controlando en cierta medida los niveles de glucemia, y siendo de utilidad para individuos diabéticos no insulino-dependientes. También tienen la función de actuar como sustrato para la fermentación por las bacterias del colon, produciendo ácidos de cadena corta como ácido acético, propiónico y butírico, que se absorben influyendo en el metabolismo del colesterol (Nayak y col., 2000).

Sin embargo, las *fibras insolubles* apenas son fermentadas por la microbiota intestinal, comportándose fundamentalmente como formadoras de volumen, incrementando el peso de las heces y disminuyendo el tiempo de tránsito intestinal, siendo indicada en el tratamiento del estreñimiento y problemas asociados al tránsito intestinal (Pedraza y Goñi, 1998).

La ingesta de fibra debería ser de 30-40 g por día o de 10-14 g por 1.000 Kcal, de los cuales el 70% debería corresponderse con fibra soluble, y el resto con fibra insoluble (Pedraza y Goñi, 1998; Grigelmo y Martín, 1999). Actualmente está reconocido que un consumo de fibra mayor de 25 g día reduce un 36% el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, y si se alcanza un consumo de 29 g de fibra/día este riesgo desciende un 41% (Wardlaw, 1999).

Actualmente, la dieta media española es deficiente en fibra, ya que el consumo diario es de aproximadamente 22 g de fibra total, de los cuales el 40% corresponde a fibra soluble y el resto a fibra insoluble. Para enriquecer alimentos se utilizan tanto fibras de cereales como de frutas, estas últimas prometen ventajas con respecto a la de cereales que se resumen en la Tabla 1.

Además, la fibra de frutas se incluye dentro del grupo de la llamada fibra antioxidante, por la presencia en la misma de compuestos antioxidantes (ácido ascórbico y polifenoles, fundamentalmente). La adición de fibra a los productos lácteos conjuga

dos condiciones: (i) actuar sobre las funciones gastrointestinales, regulando los procesos de absorción, tránsito, actividad y calidad de la microbiota colónica, así como la formación y eliminación de heces, (ii) actuar sobre los sistemas redox y antioxidantes, contribuyendo al mantenimiento, integridad y funcionalidad de las membranas celulares y evitando la peroxidación de las lipoproteínas de membrana y de las proteínas funcionales y estructurales.

Tabla 1. Ventajas de las fibras de frutas respecto a la fibra de cereales

-
- Mayores contenidos de fibra total y fibra soluble
 - Composición más equilibrada
 - Menor contenido calórico
 - Menor contenido en ácido fítico
 - Mayor capacidad de retención de agua y aceite
 - Mayor fermentabilidad
 - Mayor versatilidad para un amplio rango de aplicaciones
-

Fuente: Saura Calixto y Larrauri, 1996.

Compuestos bioactivos en las fibras de frutas

La fibra de frutas, y como ejemplo la fibra de cítricos, se acompaña de diversos compuestos bioactivos (ácido ascórbico, fenoles, carotenoides, etc.) (Fernández-López y col., 2009). El ácido ascórbico (vitamina C) y los flavonoides pueden inhibir ciertas enfermedades debido a su potencial antioxidante (Hertog y col., 1993; Salah y col., 1995; Fernández-Ginés, 2003). Se ha demostrado la influencia del ácido ascórbico en procesos tales como la absorción de hierro, el metabolismo de aminoácidos y los procesos de oxidoreducción de hormonas y células (Buettner, 1993). Esto ha llevado a pensar que la vitamina C, como un antioxidante natural, puede inhibir el desarrollo de las principales condiciones clínicas para el desarrollo del cáncer (Diplock, 1991). Los flavonoides también están atrayendo cada vez más la atención debido a sus propiedades como antioxidantes, agentes anticancerígenos,

antiinflamatorios y por sus efectos de antiperoxidación de los lípidos (Elangovan y col., 1994; Rice-Evans y col., 1997). Además, Frazier (1980) describió que los flavonoides de los cítricos tenían también propiedades antimicrobianas. Estos compuestos se han mostrado efectivos en un amplio rango no solo de patógenos humanos, sino también frente a hongos y microorganismos implicados en la alteración de alimentos (Harich, 1997).

Efectos saludables atribuidos a los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos contribuyen a las propiedades sensoriales de los alimentos, particularmente al color y a la astringencia. La importancia de sus efectos saludables está incrementando el interés entre la comunidad científica, productores de alimentos y consumidores, debido al descubrimiento y propagación de sus propiedades funcionales (antioxidantes y antimicrobianas) y a sus actividades farmacológicas y bioquímicas (anticarcinogénicas, antiinflamatorias y antiaterogénicas) (Naczki y Shahidi, 2004). Concretamente la hesperidina se usa en productos farmacéuticos diseñados para reducir la permeabilidad y fragilidad de la membrana de las células sanguíneas. La microbiota del colon transforma los flavonoides en compuestos fenólicos de bajo peso molecular, los cuales pueden tener actividades biológicas protectoras en el colon. El ácido caféico y el ácido ferúlico son agentes protectores contra el ion nitrito, previniendo la formación de nitrosaminas y nitrosamidas tanto en alimento, como en *in vivo*, pudiendo inhibir o bloquear la formación de carcinomas (Krishnaswamy, 2001; Garrote y col., 2004).

3. Leches fermentadas enriquecidas con fibra

Los productos lácteos fermentados, están reconocidos como alimentos beneficiosos para la salud, por la presencia y acción de las bacterias fermentadoras

(Tamime y Deeth, 1980; Fernández-García y McGregor, 1997; Sillas-Santos, 2003), y esta imagen saludable ha favorecido un importante incremento en su consumo. Los productos lácteos fermentados contienen niveles de ácidos orgánicos y otros compuestos, que ayudan a mejorar los síntomas de determinadas enfermedades como la diarrea y la hipercolesterolemia (Rubin y Coll, 1982). Los productos lácteos no contribuyen al aporte total de fibra de la dieta, ya que no son buena fuente de fibra (Cueva y Aryana, 2008), por tanto la combinación de yogurt y fibra constituye un alimentos funcional con grandes efectos beneficiosos (Sanz y col., 2008).

La incorporación de fibra en los productos lácteos puede conllevar cambios en la interacción entre los compuestos químicos de la fibra y del alimento durante su elaboración, modificando la biodisponibilidad de los nutrientes y provocando cambios en la textura y flavor del producto final (Birch y Parker, 1983). La propia fibra puede contener compuestos estimulantes o inhibidores de la microbiota iniciadora (Fernández-García y McGregor, 1997). Por este motivo, resulta interesante evaluar el efecto particular de cada fibra frente a productos y microorganismos concretos.

La mayoría de estudios sobre incorporación de fibra a leches fermentadas se centra en su efecto en las características sensoriales. Se han realizado estudios con fibra dietética insoluble, de distintos orígenes, fibra de soja, fibra de arroz, fibra de remolacha, fibra de avena, fibra de maíz, para la elaboración de leches fermentadas enriquecidas con fibra, en una proporción de 1.3%, que representa aproximadamente el 10% de las recomendaciones diarias de fibra, si se consume diariamente un 200 mL de yogurt (Fernández-García y McGregor, 1998). En ellos, la fibra, incorporada antes de pasteurizar la leche, aceleraba el proceso de acidificación. Las fibras de arroz y maíz incrementaron la viscosidad aparente de los yogures, mientras que la de soja y remolacha no. De todas las fibras ensayadas la fibra de avena fue la que obtuvo yogures con mejor valoración sensorial y mejores características de textura (Fernández-García y McGregor, 1998).

En otros estudios se ensayaron fibras de inulina, bambú, manzana y trigo (Dello Staffolo y col., 2004); los resultados mostraron que el tipo de fibra fue un factor significativo, aunque el análisis sensorial no mostró diferencias respecto al control, pero los yogures enriquecidos obtuvieron mejor valoración tanto para el color, flavor y textura. La adición de fibra de manzana provocó las mayores diferencias respecto al control y se estableció que la adición de 1.3% de fibra dietética en yogures resultaba en productos de una buena aplicación comercial.

Aportela-Palacios y col., (2005) enriquecieron yogures con salvado de trigo tostado y natural a tres niveles 1.5, 3.0 y 4.5%, además de suplementarlo con citrato de calcio. La presencia de fibra y calcio provocó un aumento del pH a concentraciones de 3 y 4.5%. Este aumento no se pudo relacionar con la proporción de ácido láctico producido por la actividad metabólica de los cultivos lácticos.

García-Pérez y col. (2006) incorporaron fibra de naranja a yogures; la adición de fibra de naranja provocó un ligero descenso del pH de la leche debido a la liberación de compuestos ácidos procedente de la fibra, que favorecería el descenso del pH, sin afectar el proceso de fermentación del yogurt. El estudio encontró que la acidez titulable fue superior en los yogures con fibra y que las propiedades reológicas se vieron modificadas por la adición de la fibra.

Cueva y Aryana (2008) elaboraron un yogurt con vitamina B1, vitamina B3, ácido fólico, manganeso y magnesio a 0%, 30%, 60% y 90% de las dosis diarias recomendadas, además de una cantidad constante de fibra. La incorporación de estos nutrientes no afectó a las características sensoriales, ni a los recuentos microbianos.

Sanz y col (2008) obtuvieron fibra de la parte no comestible de los espárragos, mediante distintos métodos de extracción y secado, y la incorporaron a yogures. La incorporación de esta fibra incrementó la consistencia de los yogures, especialmente la extraída con etanol y liofilizada. En cuanto a la aceptación del producto, los yogures con fibra extraída con agua y secada al horno obtuvieron mejor puntuación para el

aroma, textura, olor y aceptación global. Por el contrario la mejor valoración de color fue para los yogures con fibra obtenida con etanol y liofilizada. La incorporación de fibra provocó un ligero descenso del pH, seguramente debido al carácter ácido de la fibra al igual que se ha observado en otros estudios (Fernández-García y McGregor, 1997; Lario y col., 2004; García-Pérez y col., 2006).

4. Efectos de las fibras en la microbiota láctica

Existen pocos estudios a este respecto, así Lario y col. (2004) estudiaron la evolución de la microbiota en yogures enriquecidos con fibra de naranja, incorporada antes o después de la pasteurización de la leche. Estos autores observaron una aceleración de la fermentación en los yogures enriquecidos con fibra de naranja incorporada antes de la pasteurización, atribuyendo este hecho a que la fibra al sufrir el tratamiento térmico junto a la leche liberaría compuestos ácidos. Respecto a los recuentos microbianos, la adición de fibra, antes o después de la fermentación, no afectó a los recuento de viables ni a los estreptococos durante el tiempo de almacenamiento (28 días), aunque otros autores sí observaron efecto inhibitor de los aceites esenciales de los cítricos en los recuentos (Karagül-Yüceer y col., 2001). Lario y col. (2004) en este estudio observaron que la fibra de naranja inducía una ligera inhibición de lactobacilos, pero no afectaba al crecimiento de mohos y levaduras.

La mayoría de estudios sobre el efecto de la fibra en la microbiota de leches fermentadas se centran en su efecto sobre las cepas bacterianas probióticas. Lin y col. (2006) observaron que la viabilidad de las bacterias probióticas era superior en medios líquidos que en productos sólidos, de modo que las leches probióticas comerciales suelen presentarse en forma líquida. Por otro lado, los probióticos generalmente se cultivan individualmente, Shah (2000) recomendó una fermentación en dos etapas con la finalidad de obtener recuentos elevados y evitar el efecto inhibitorio del peróxido de hidrógeno y los ácidos en las bacterias probióticas. Si las bacterias probióticas se

utilizan solas para obtener leches fermentadas la acidificación es lenta (alrededor de 38 h) tal y como observaron Saxelin y col. (1999). Guzler-Akin and Akin (2007) recomendaron la adición de cisteína y la incubación por debajo de 43°C para la elaboración de yogures probióticos. Dave and Shah (1998) observaron que la adición de cisteína afectó negativamente a la viabilidad de *S. thermophilus* pero Sendra y col. (2008) no observaron el mismo efecto. Donkor y col. (2006) revisaron los factores que afectan a la supervivencia de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* spp. en yogur, y resultaron ser: cepa de bacteria probiótica, dosis inoculada, temperatura de incubación, promotores del crecimiento, presencia de peróxido de hidrógeno y oxígeno, concentración de metabolitos e inhibidores, ácido láctico y acético, capacidad tamponante, temperatura de almacenamiento y disponibilidad de nutrientes. De entre ellos, los principales factores son pH final y acumulación de ácidos orgánicos (Dave y Shah, 1997; Shah, 2000). Ravula y Shah (1998) observaron que cuando las bacterias probióticas crecen juntas con los cultivos del yogur la actividad metabólica de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* durante el almacenamiento (liberación de ácidos orgánicos y aminoácidos) pueden afectar la viabilidad de los probióticos. Dave y Shah (1997) evidenciaron que *S. thermophilus* presentó un efecto antagonístico del crecimiento de bifidobacterias. Shankar and Davies (1976) observaron que *B. bifidum* crece mejor en presencia de *L. bulgaricus* debido a su relación simbiótica. Los aminoácidos libres resultantes de la acción proteolítica de *L. bulgaricus* promovería el crecimiento de bifidobacterias (Singh y col., 1980). Cuando los probióticos se mezclan con los cultivos del yogur, se da un mayor contenido en factores de crecimiento como péptidos y aminoácidos en las leches fermentadas que potenciarían el crecimiento de *L. acidophilus* y mantendrían el crecimiento de *B. lactis* y *Lactobacillus paracasei* (Donkor y col., 2006).

Algunos autores han estudiado las interacciones entre diferentes fibras y bacterias probióticas, en la Tabla 2 se presenta un resumen de estos trabajos. Se han estudiado

fibras de diversos orígenes con éxito en el aumento de la viabilidad y supervivencia de cepas probióticas como son: preparados comerciales (Raftiloses P95, fructooligosacáridos de cadena corta, inulina, oligofructosa, galactosil-lactosa, lactulosa, raftilosa); frutas (manzana y peras) para vehicular *L. casei*; rafinosa y oligosacáridos de altramuces; y fibra de naranja y limón.

El mayor incremento de bifidobacterias se observa con la incorporación de inulina, xilooligosacáridos y lactulosa, y para lactobacilos con la adición de fructooligosacáridos (Rastall y Maitin, 2002), inulina y raftilosa (Desai y col. 2004). Se ha observado que la lactulosa no es efectiva para mantener la viabilidad de *Lactobacillus* spp. (Ozer y col., 2005). La combinación de bacterias probióticas y cultivos iniciadores del yogur favorece el crecimiento y supervivencia de las bacterias probióticas en leche fermentada (Sendra y col, 2008).

En estudios sobre leches fermentadas probióticas con y sin fibra (inulinas y fibra de naranja) comercializadas en España la presencia de fibra no pareció influir a las poblaciones de microbiota láctica probiótica (Fayos, 2005). Hay todavía un gran número de fibras que habitualmente se añaden a yogures y leches fermentadas cuyas interacciones con la microbiota están sin estudiar. Para utilizar la denominación 'probiótico' debe estar probado en estudios clínicos que la/s cepas microbianas utilizadas efectivamente tienen efectos beneficiosos para la salud.

A la vista de esta premisa y dado que la presencia de determinadas fibras o hidrolizados puede potenciar el crecimiento de determinados probióticos o contribuir a mantener su viabilidad, es previsible que se intensifiquen los estudios sobre las interacciones fibras-bacterias probióticas para optimizar el efecto probiótico de los alimentos diseñados.

Tabla 2.- Cuadro resumen de los estudios más recientes realizados sobre el efecto de la fibra de distintos orígenes sobre la microbiota en productos lácteos.

Producto lácteo	Tipo de fibra	Efectos sobre la microbiota	Autores
Yogurt	Fibra de naranja	Aceleró la acidificación durante la fermentación. No afectó al crecimiento de mohos y levaduras, ni a los recuento de viables y <i>Streptococcus</i> . Ligera inhibición del crecimiento de los <i>Lactobacillus</i> .	Lario y col. 2004
	Fibra de naranja	Mayor acidez titulable y mayor producción de ácido láctico.	García-Pérez y col. 2006
	Fibra comercial	Ninguna de las fibras afectó a las bacterias ácido lácticas	Cueva y col. 2008
Yogurt probiótico	Inulina, lactulosa	Estimulación de crecimiento del <i>L. acidophilus</i> y <i>B. bifidum</i>	Özer y col. 2005
	Inulina, Hi maíz, fructo-oligosacárido	Aumentó la viabilidad de las bacterias probióticas <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Bifidobacterium</i> spp.	Capela y col. 2006
Leche fermentada probiótica	Oligosacáridos de la semilla de altramuz	Incrementó las poblaciones de <i>B. lactis</i> y <i>L. acidophilus</i> al final de la fermentación	Martínez-Villaluengo y col. 2005
	Inulina	Efecto beneficioso sobre la viabilidad de las bifidobacterias durante el almacenamiento.	Varga y col. 2006
	Oligosacáridos de la semilla de altramuz	Efecto beneficioso en la supervivencia de <i>B. lactis</i> y <i>L. acidophilus</i> , y descenso de los recuentos de probióticos durante el almacenamiento.	Martínez-Villaluengo y col. 2006
	Fibra de naranja y limón	Favoreció el crecimiento y una mayor supervivencia de bacterias probióticas	Sendra y col. 2008
Leche desnatada probiótica	Hi-maíz, lactulosa, raftilosa e inulina	Mejoró el ratio de crecimiento y redujo el tiempo de fermentación en <i>Lactobacillus</i>	Desai y col. 2004
Bebida simbiótica a base de avena	Fibra dietética	Mayor supervivencia de <i>L. plantarum</i> y <i>L. casei</i> que <i>L. acidophilus</i>	Gokavi y col. 2005
Fórmulas infantiles en polvo probióticas	Oligosacáridos digeribles	El número de bacterias se mantuvo sobre el nivel recomendado	Pérez-Conesa y col. 2005
Queso feta probiótico	Piezas de frutas (manzana y pera)	Reactivación del <i>L. casei</i>	Kourkoutas y col. 2006

Conclusiones

La mayoría de estudios sobre la adición de fibras a productos lácteos fermentados se centra en su efecto en las características sensoriales, y son escasos los trabajos que estudian el efecto de la fibra en la microbiota. La adición de fibras y derivados (especialmente oligosacáridos) no interfiere en el proceso de fermentación de los productos lácteos y ejerce un efecto beneficioso en el crecimiento y supervivencia de cepas de bacterias probióticas. Este efecto es especie específico, pues no todas las fibras u oligosacáridos son igualmente efectivos frente a las bacterias probióticas de uso común en leches fermentadas. En general, inulina, rafinosa, fructoligosacáridos son beneficiosas para bifidobacterias y lactobacilos, y la lactulosa es solo beneficiosa para las bifidobacterias. Es necesario probar el efecto simbiótico de las fibras con las bacterias probióticas que se pretenden utilizar, para garantizar que se mantiene los recuentos adecuados, a lo largo de toda la vida comercial de la leche fermentada.

Referencias

- Aportela-Palacios, A., Sosa-Morales, M.E., Vélez-Ruiz, J.F. 2005. Rheological and physicochemical behavior of fortified yogurt, with fiber and calcium. *Journal of Texture Studies*, 36, 333-349.
- Birch, G.G., Parker, K.J. 1983. Dietary Fiber. *Applied Science Publication*, New York.
- Buettner, G.R. 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha tocopherol and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300, 535-543.
- Capela, P., Hay, T.K.C., Shah, N.P. 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotics organisms in yogurt and freeze-dried yogurt. *Food Research International*, 39, 203-211.
- Cueva, O., Aryana, K.J. 2008. Quality attributes of a heart healthy yogurt. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 537-544.
- Dave, R.I., Shah, N.P. 1996. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Journal Dairy Science*, 79, 1529–1537.
- Dave, R.I., Shah, N.P. 1997. Viability of yogurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter culture. *International Dairy Journal*, 7, 31–41.
- Dave, R.I., Shah, N.P. 1998. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *Journal Dairy Science*, 81, 2804–2816.
- Dello Staffolo, M., Bertola, N., Martino, M., Bevilacqua, A. 2004. Influence of dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yogurt. *International Dairy Journal* 14, 263-268.
- Desai, A.R., Powell, I.B., Shah, N.P. 2004. Survival and activity of probiotic *Lactobacilli* in skim milk containing prebiotics. *Journal Food Science*, 69 (3), 57–60.
- Diplock, A.T. 1991. Antioxidants nutrient and disease prevention: an overview. *American Journal of Clinical Nutrition*. 53, 189-193.
- Donkor, O.N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., Shah, N.P. 2006. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 16 (10), 1181–1189.
- Durán, E. 2006a. Leches fermentadas funcionales. Los probióticos lideran el mercado. *Alimarket*, Abril 2006, 120-127.
- Durán, E. 2006b. Yogures y postres, los bífudis tocan techo. *Alimarket*, Diciembre 2006, 235-255.

- Elangovan, V., Sekar, N., Govindasamy, S. 1994. Chemoprotective potential of dietary bipoflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumorigenesis. *Cancer Letters*. 87, 107-113.
- Fayos, P. (2005). Interacción entre L casei CECT 475, L acidophilus CECT 903 y B. bifidum CECT 870 y fibra de cítricos. Aplicación a leches fermentadas probióticas. TFC-S-191. Trabajo Final de Carrera Ingeniero Agrónomo. Universidad Miguel Hernández.
- Fernández-García, E., McGregor, J.U. 1997. Fortification of sweetened plain with insoluble dietary fiber. *Zeitschrift für Lebensmittel -Untersuchung und -Forschung*, 204, 433-437.
- Fernández-García, E., McGregor, J.U., Traylor, S. 1998. The Addition of Oat Fiber and Natural Alternative Sweeteners in the Manufacture of Plain Yogurt. *Journal Dairy Science*, 81(3), 655-663.
- Fernández-Ginés, J.M. 2003. Carotenoides: Aspectos funcionales y nutritivos. En: J.A. Pérez-Alvarez, J. Fernández-López y E. Sayas-Barberá (Eds), *Alimentos funcionales y Dieta Mediterránea* (pp. 113-130). Universidad Miguel Hernández
- Fernández-López, J., Sendra, E., Navarro, C., Sayas-Barberá, E., Pérez-López, J.A. 2009. Storage stability of a high dietary fibre powder from orange by-products. *International Journal Food Science and Technology* (44, 748-756).
- Frazier, S. F. 1980. Antimicrobial composition of matter from naturally occurring flavonoid glycosides, *US Pat.* 4,238,483.
- García-Pérez, F.J., Sendra, E., Lario, Y., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., Pérez-Alvarez, J.A. 2006. *Milchwissenschaft* 61(1), 55-59.
- Garrote, G., Cruz, J.M., Moure, A., Dominguez, H., Parajó, J.C. 2004. Antioxidant activity of byproducts from the hydrolytic processing of selected lignocellulosic materials. *Trends in Food Science & Technology* 15, 191-200.
- Gokavi, S., Zhang, L., Huang, M.-K., Zhao, X., Guo, M. 2005. Oatbased symbiotic beverage fermented by Lactobacillus plantarum, Lactobacillus paracasei ssp. casei, and Lactobacillus acidophilus. *Journal Food Science*, 70 (4), 216–223.
- Grigelmo Miguel, N., Martín Belloso, O. 1999. Comparison of dietary fibre from by-products of processing fruits and greens and from cereals. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 32 (8), 503-508.
- Guzler Akin, M.B., Akin, M.S. 2007. Effects of cysteine and different incubation temperatures on the microflora, chemical composition and sensory characteristics of bio-yogurt made from goat's milk. *Food Chemistry*, 100 (2), 788–793.

- Harich, J. 1997. Antimicrobial grapefruits extracts. *US Pat.* 5,631,001
- Hernández, T., Hernández, A., Martínez, C. 1995. Fibra alimentaria. Concepto, propiedades y métodos de análisis. *Alimentaria*. Abril/1995, 19-25.
- Hertog, M.G.L., Feskeens, E.J.M., Hollman, C.H., Katan, M.B., Kromhout, D. 1993. Dietary antioxidante flavonoids and risk of heart disease; the Zutphen elderly study. *Lancet*, 342(8878), 1007-1011.
- Karagül-Yüceer, Y., Wilson, J.C., White, C.H. 2001. Formulations and processing of yogurt affect the microbial quality of carbonated yogurt. *Journal Dairy Science*, 84(3), 543-550.
- Kourkoutas, Y., Bosnea, L., Taboukos, S., Baras, C., Lambrou, D., Kanellaki, M. 2006. Probiotic chesse production using *Lactobacillus casei* cells immobilized on fruits pieces. *Journal Dairy Science* 89(5), 1439-1451.
- Krishnaswamy K. 2001. Nonnutrients and cancer prevention. *ICRM Bulletin*, 31. Disponible: <http://www.icmr.nic.in>.
- Lario, Y., Sendra, E., García-Pérez, F.J., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., Pérez-Alvarez, J.A. 2004. Evolution of microbial populations of fiber enriched yogurt during commercial shelf-life. *Milchwissenschaft*, 59(11/12), 646-650.
- Lin, W.-H., Hwang, C.-F., Chen, L.-W., Tsen, H.-Y. 2006. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiology*, 23 (1), 74–81.
- Lourens-Hatting, A., Viljeon, B.C. 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11, 1–17.
- Martinez-Villaluengo, C. Frías, J., Vidal-Valverde, C., Gómez, R. 2005. Raffinose Family of oligosaccharides from lupin seeds as prebiotics: Application in dairy products. *Journal of Food Protection* 68(6), 1246-1252.
- Martinez-Villaluengo, C., Frías, J., Gómez, R., Vidal-Valverde, C. 2006. Influence of addition of raffinose family oligosaccharides on probiotic survival in fermented milk during refrigerated storage. *International Dairy Journal*, 16(7), 768-774.
- Mazza, G. 2000. *Alimentos funcionales*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza.
- Naczki, M., Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*, 1054(1-2), 95-111.
- Nayak, S.K., Pattnaik, P., Mohanty, A.K. 2000 Dietary fibre: a low calorie dairy adjunct. *Indian Food Industry*, 19 (4), 268-278.

- Özer, D., Akin, S., Özer, B., 2005. Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in acidophilus–bifidus yogurt. *Food Science and Technology Internacional*, 11 (1), 19–24.
- Pedraza L. A., Goñi I. 1998 Consideraciones sobre el consumo de preparados comerciales de fibra alimentaria. *Alimentaria*, Enero-Febrero/1998: 35-40.
- Pérez-Alvarez, J.A., Sayas-Barberá, E., Fernández-López, J. 2003. Aspectos generales de los alimentos funcionales. En: J.A. Pérez-Alvarez, J. Fernández-López y E. Sayas-Barberá (Eds), *Alimentos funcionales y Dieta Mediterránea* (pp. 27-38). Universidad Miguel Hernández
- Perez-Conesa, D., Lopez, G., Ros, G. 2005. Fermentation capabilities of bifidobacteria using nondigestible oligosaccharides, and their viability as probiotics in commercial powder infant formula. *Journal Food Science*, 70 (6), 279–285.
- Rastall, R., Maitin, V. 2002. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 490–496.
- Ravula, R.R., Shah, N.P. 1998. Viability of probiotic bacteria in fermented frozen dairy desserts. *Food Aust.* 50, 136–139.
- Rice Evans, C., Miller, N.J., Paganda, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
- Recio, I., López-Fandiño, R. 2005. Efectos en la salud de los ingredientes lácteos funcionales. *Alimentación, Nutrición y Salud* 12(4), 121-131.
- Rubin H.E., Nerad, T. Vaughan, F. 1982. Lactate acid inhibition of *Salmonella typhimurium* in yogurt. *Journal of Dairy Science*, 65(2), 197-203
- Sanz, T., Salvador, A., Jiménez, A. 2008. Yogurt enrichment with functional asparagus fiber. Effect of fibre extraction method on rheological properties, colour, and sensory acceptance. *European Food Research and Technology*, 227, 1515-1521.
- Salah, N., Miller, N.J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G.P., Rice Evans, C. 1995. Polyphenolic flavonols as scavenger of aqueous phase radicals and a chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 322, 339-346.
- Saura Calixto, F., Goñi, I. 2005. Alimentos funcionales: fibra dietética y antioxidantes de la dieta española. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 12(4), 132-149.
- Saura Calixto, F., Larrauri. A. 1996. Nuevos tipos de fibra dietética de alta calidad. *Alimentación, equipos y tecnología*. Enero-Febrero/1996: 71-74.
- Sendra, E., Fayos, P., Lario, Y., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., Pérez-Alvarez, J.A. 2008. Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. *Food Microbiology* 25, 13-21.

- Saxelin, M., Grenov, B., Svensson, U., Fondén, R., Reniero, R., Mattila-Sandholm, T. 1999. The technology of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 387–392.
- Shah, N.P. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal Dairy Science*, 83, 894–907.
- Shankar, P., Davies, F. 1976. Associative bacterial growth in yogurt starters: initial observations on stimulatory factors. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 30, 31–32.
- Silla Santos, H. 2003. Microorganismos lácticos con efectos fisiológicos beneficiosos para la salud humana y animal. En: J.A. Pérez-Alvarez, J. Fernández-López y E. Sayas-Barberá (Eds), *Alimentos funcionales y Dieta Mediterránea* (pp. 165-188), Universidad Miguel Hernández
- Silveira MB, Monereo S, Molina B. 2003. Alimentos funcionales y nutrición óptima. ¿Cerca o lejos?. *Revista Española de Salud Pública*, 77 (3), 317-331.
- Singh, J., Khanna, A., Chandar, H. 1980. Effect of incubation temperature and heat treatments of milk from milk of cow and buffalo on acid and flavour production by *St. thermophilus* and *L. bulgaricus*. *Journal of Food Protection*, 43, 399–400.
- Tamime, A.Y. Deeth, H.C. 1980. Yogurt: Technology and biochemistry. *Journal of Food Protection*, 43, 939-977.
- Varga, L., Szigeti, J., Gyenis, B. 2006. Influence of chicory inulin on the survival of microbiota of a probiotic fermented milk during refrigerated storage. *Annals of Microbiology*, 56(2), 139-141.
- Wardlaw, G.M. 2006. *Perspectivas en nutrición* (5th), (pp. 417-540) McGraw-Hill Higher Education.

Carbohidratos prebióticos derivados de la lactosa.

Corzo, N*., Montilla, A., Cardelle-Cobas, A., Olano, A.

Instituto de Fermentaciones Industriales, C.S.I.C. C/ Juan de la Cierva, 3; 28006 Madrid, España

Teléfono: + 34 91 258 74 85 /91 562 29 00 Ext 307 Fax: + 34 91 564 48 53

E-mail: ncorzo@ifi.csic.es

1. Introducción

El término prebiótico, definido como ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al huésped mediante la estimulación del crecimiento y/o la actividad de un número limitado de bacterias en el colon, fue introducido por Gibson y Roberfroid en 1995, sin embargo, hace más de cincuenta años que es conocido el efecto beneficioso de algunos carbohidratos sobre la flora intestinal. Los prebióticos se caracterizan por no ser digeridos por los jugos digestivos y llegar intactos al colon donde son fermentados selectivamente por la microflora colónica considerada beneficiosa (bifidobacterias y lactobacilos) en detrimento de las no deseables (bacteroides, clostridia, *E coli*) (Roberfroid, 2003; García Peris y Velasco Gimeno, 2007).

Entre las múltiples enzimas de origen bacteriano presentes en el intestino se incluyen las β -glucuronidasas capaces de liberar sustancias carcinógenas a partir de conjugados del ácido glucurónico. Las azo y nitrorreductasas reducen sustratos nitrogenados a aminas, que son generalmente más tóxicas que los productos de origen y la nitrato reductasa que genera el anión nitrito. La producción de metabolitos en heces tales como el amoníaco, originado a partir de proteínas y de la urea se relaciona con la formación de tumores. Otros metabolitos tales como fenoles y cresoles son también potenciales promotores de enfermedades del colon. Las bifidobacterias y los lactobacilos no producen cantidades significativas de dichas enzimas por lo que están consideradas como microorganismos beneficiosos (Méndez y Olano, 1979). Por tanto, el mantenimiento de tasas elevadas de microorganismos

probióticos en la flora microbiana intestinal es fundamental para preservar la salud del individuo. Este hecho, ha llevado a la búsqueda de carbohidratos que, utilizados como ingredientes en alimentos, sean capaces de favorecer la presencia de bifidobacterias y lactobacilos en el intestino grueso.

Existe un amplio número de carbohidratos no digeribles, sin embargo no todos tienen actividad prebiótica, de hecho parece que las bacterias metabolizan más fácilmente los carbohidratos de tamaño pequeño (oligosacáridos) que los de mayor tamaño (polisacáridos). Entre los más utilizados en la industria alimentaria destacan los fructanos tipo inulina (inulina y oligofructosa) (FOS), galactooligosacáridos (GOS) y lactulosa (Roberfroid, 2003; Goulas y col., 2007).

1.1. Galactooligosacáridos (GOS) derivados de la lactosa. Oligosacáridos de la leche

Es sabido que en la leche, además de lactosa, hay un número variable de oligosacáridos cuya composición y contenido depende de la especie animal de que se trate y del estado de lactación. La mayor parte están constituidos por una molécula de lactosa en su extremo reductor a la que mediante la acción de diferentes glicosiltransferasas, se le unen residuos de galactosa, N-acetil-glucosamina, fucosa o ácido N-acetil-neuramínico en distintas proporciones. Los enlaces glicosídicos de las moléculas son resistentes a las enzimas digestivas y por tanto los oligosacáridos llegan intactos al colon donde son metabolizados por la flora intestinal. En la leche humana, el contenido en oligosacáridos es aproximadamente de 5-10 g/L y se han identificado más de 130 compuestos (Bode, 2006).

Aunque los beneficios que aporta el consumo de dichos oligosacáridos son considerados únicos, su utilización en la elaboración de alimentos a gran escala es prácticamente imposible dado su escaso contenido en las leches habitualmente empleadas en la industria (vaca, oveja, cabra, búfala). Por ello existe un gran interés

en el desarrollo de procedimientos de síntesis de oligosacáridos derivados de lactosa que presenten propiedades prebióticas.

2. Galactooligosacáridos (GOS) derivados de la lactosa. Transglicosilación

Los GOS son oligosacáridos no digeribles que contienen de 2-20 moléculas de galactosa y una de glucosa (Miller y Whistler, 2000), y se diferencian entre sí en la longitud de cadena y tipo de enlaces.

Estos azúcares, además de su reconocido carácter prebiótico, ya que estimulan el crecimiento de bacterias ácido lácticas y bifidobacterias en el intestino humano (Sako y col., 1999), también presentan otra serie de propiedades beneficiosas para la salud tales como reducir el nivel de colesterol en suero, prevenir el cáncer de colon y favorecer la absorción del calcio (Tuohy y col., 2005).

Además, los GOS tienen otras propiedades tales como ser estables en condiciones ácidas y durante el procesado de alimentos, hecho que les hace potencialmente aplicables a un amplio número de alimentos; presentar bajo valor calórico, ya que pasan el intestino delgado sin ser digeridos; no estar implicados en la formación de caries, ya que no son metabolizadas por los microorganismos de la cavidad bucal. (Splechtna y col., 2006).

Debido a todas las alegaciones de salud de los GOS, la demanda de alimentos conteniendo estos carbohidratos se ha incrementado enormemente, particularmente en Japón y Europa (Gaur y col., 2006). Por ello, se han realizado numerosos estudios encaminados a optimizar la producción de GOS, especialmente mediante transgalactosilación por vía enzimática ya que la síntesis química es muy tediosa (Sears y Wong, 2001).

Los GOS son compuestos obtenidos industrialmente a partir de lactosa mediante transglicosilación catalizada por β -galactosidasas, enzimas que en determinadas

condiciones son capaces de catalizar tanto la hidrólisis de la lactosa como la formación de un enlace glicosídico entre la galactosa liberada en la hidrólisis y la lactosa u otros carbohidratos presentes en el medio de reacción. La composición de la mezcla de GOS resultante dependerá de la fuente de la enzima empleada, concentración y naturaleza del sustrato y de las condiciones de reacción (pH, temperatura y tiempo) (Prenosil y col., 1987; Boon y col., 2000; Splechtna y col., 2006).

2.1. Enzimas utilizadas para la obtención de GOS

El origen de las β -galactosidasas puede ser muy variado utilizándose microorganismos, plantas y animales, presentando diferentes propiedades. La utilización de microorganismos presenta ventajas en cuanto a manipulación, bajo costo, altos rendimientos en la síntesis, etc. La β -galactosidasa más estudiada ha sido la de *Escherichia coli*; sin embargo, considerando que las aplicaciones van destinadas a alimentos, es lógico utilizar enzimas GRAS (generally recognized as safe) tales como las que proceden de *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Kluyveromyces lactis* y *K. fragilis* (Roy y Gupta, 2003); existiendo diferentes preparados de β -galactosidasas comerciales (Panesar y col., 2006).

2.2. Naturaleza de los GOS formados

La formación de GOS durante la hidrólisis enzimática de la lactosa es bien conocida habiéndose estudiado extensamente la influencia, sobre la actividad enzimática y la cantidad y naturaleza de los oligosacáridos formados, de factores tales como: temperatura y pH (Mahoney, 1998; Jurado y col., 2004); utilización de disolventes orgánicos (Finch y Yoon, 1997; Yoon y McKenzie, 2005), inmovilización sobre diferentes matrices (Gaur y col., 2006), etc.

Además, en los estudios realizados hasta el momento se ha observado la gran influencia que, sobre las propiedades prebióticas, tienen la estructura química, es

decir, número de monómeros que contiene, naturaleza de los mismos y tipo de enlaces presentes en la molécula (Palframan y col., 2003; Delzene, 2003; Tzortis y col., 2005).

Mahoney (1998) realizó una interesante revisión sobre la formación de GOS durante la hidrólisis de la lactosa con diferentes tipos de β -galactosidasas, indicando las estructuras de los oligosacáridos formados así como las cinéticas de reacción. La acción de las β -galactosidasas sobre lactosa, dependiendo del origen, da lugar a disacáridos : β -D-Gal(1 $\rightarrow$ 6)-D-Glc (alolactosa) y β -D-Gal(1 $\rightarrow$ 6)-D-Gal (6 galactobiosa) además de otros disacáridos con enlaces (1 $\rightarrow$ 2) y (1 $\rightarrow$ 3) en menor cantidad; trisacáridos: β -D-Gal(1 $\rightarrow$ 6)-lactosa (6' galactosil lactosa); β -D-Gal(1 $\rightarrow$ 4)-lactosa (4' galactosil lactosa); β -D-Gal(1 $\rightarrow$ 3)-lactosa (3' galactosil lactosa) y en menor proporción tetra- y pentasacáridos. En cuanto al tipo de enlace en los GOS formados predomina el β (1 $\rightarrow$ 6) seguido del β (1 $\rightarrow$ 3) y del β (1 $\rightarrow$ 2).

Recientemente (Cardelle-Cobas y col., 2008a) se ha estudiado la formación de GOS utilizando la actividad β -galactosidasa que presenta el preparado comercial Pectinex Ultra SP-L producido por *A. aculeatus*. Además del trisacárido, 6' galactosil lactosa, se detectó la formación de disacáridos como la alolactosa y la 6 galactobiosa, pudiendo comprobar la gran influencia del pH en la formación de oligosacáridos; así la formación de los trisacáridos está favorecida a pH 6,5 mientras que la de los disacáridos está favorecida a pH 4,5 (Figura 1). Los resultados obtenidos indican que este tipo de preparado enzimático puede utilizarse para obtener mezclas de GOS de diferente composición dependiendo de las condiciones de reacción, por lo tanto podría usarse para una formación selectiva de disacáridos. Sanz y col., (2005) demostraron la influencia de la estructura del disacárido en el carácter prebiótico, poniendo de manifiesto el fuerte carácter prebiótico de la 6 galactobiosa. El preparado comercial Lactozym 3000 L HP G, procedente de la levadura *K. lactis*, es uno de los preparados

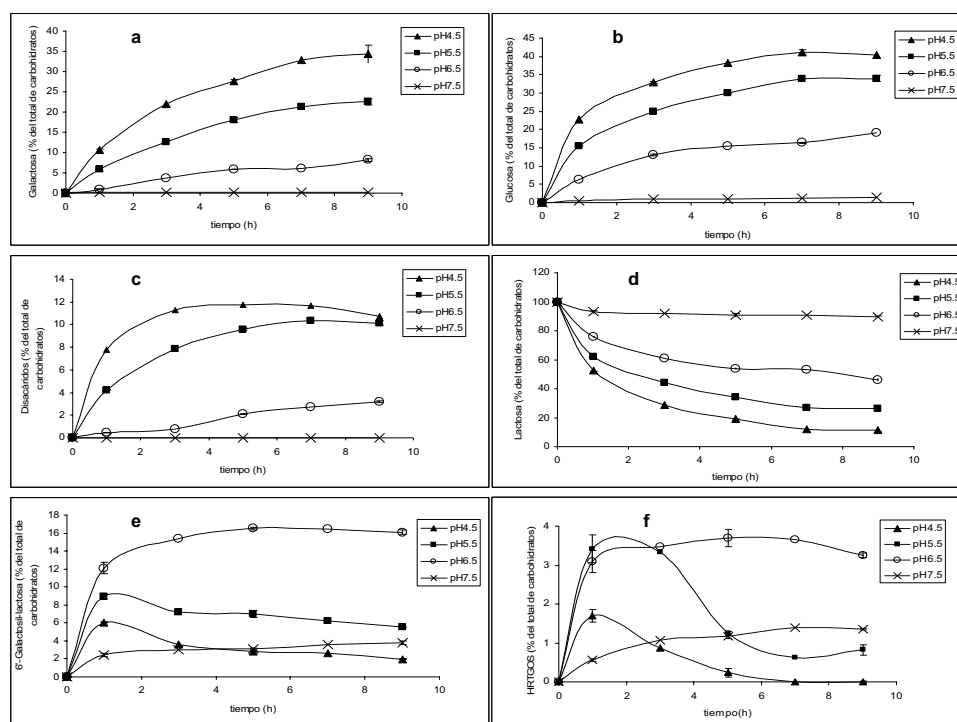


Figura 1. Efecto del pH en la hidrólisis de la lactosa y producción de GOS en las mezclas de reacción de lactosa (285 mg/mL) y el preparado comercial Pectinex Ultra SP-L (16 U/mL) a 60°C. HRTGOS: galactooligosacáridos no identificados. Los resultados son la media de dos experimentos independientes $\pm$ desviación estándar.

enzimáticos más utilizados en la industria láctea para obtener productos libres de lactosa, debido a su gran actividad hidrolítica. En determinadas condiciones, este preparado enzimático es capaz de catalizar reacciones de transglucosilación dando lugar a la formación de trisacáridos y pequeñas cantidades de oligosacáridos de alto peso molecular (Boon y col., 2000; Hung y Lee, 2002; Chockchaisawasdee y col., 2005; Bridiau y col., 2006) así como de disacáridos (Maugard y col., 2003; Cheng y col., 2006). Recientemente, Martínez-Villaluenga y col., (2008a) en un estudio de optimización de las condiciones de formación de GOS durante la hidrólisis de la lactosa utilizando este preparado, obtuvieron los mejores rendimientos de 6' galactosil lactosa a 40°C y pH 7,5, mientras que las condiciones óptimas para obtener alolactosa y galactobiosa fueron a 50°C y pH 6,5.

3. Oligosacáridos derivados de la lactulosa

La lactulosa es un disacárido constituido por una molécula de galactosa y otra de fructosa (β -D-Gal(1 $\rightarrow$ 4)-D-Fru) que se origina durante los tratamientos térmicos de la leche y se obtiene de modo industrial a partir de la lactosa mediante isomerización en medio básico (Montgomery y Hudson, 1930; Kozempel y col., 1995). Sus efectos beneficiosos sobre el crecimiento de las bifidobacterias presentes en el intestino humano son conocidos desde hace más de cincuenta años. En 1957, Petuely propuso la elaboración de un producto para la alimentación infantil basado en el tratamiento térmico de la lactosa que favorecía el crecimiento de las bifidobacterias presentes en la flora intestinal. En los años siguientes, diversos autores desarrollaron nuevos productos basándose en el mismo principio y en 1961 Adachi y Patton recapitularon en un extenso trabajo los conocimientos adquiridos sobre la lactulosa, poniendo de manifiesto sus propiedades singulares como factor de crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias intestinales.

Se sabía que las heces de los bebés alimentados con leche materna contenían mayor número de bifidobacterias que las de los bebés alimentados con biberón y se observó que en las heces aumentaba el contenido en bifidobacterias cuando a la leche del biberón se le añadía un 1% de lactulosa, lo que indujo a pensar que podría actuar como factor bifidogénico. Diez años más tarde, después de numerosos estudios sobre los efectos de la lactulosa en el organismo se pudo concluir que la lactasa humana, presente en el intestino delgado, posee una actividad muy específica de modo que es capaz de hidrolizar la lactosa pero es inactiva frente a la lactulosa (Ruttloff y col., 1967), llegando intacta al colon, donde puede ser metabolizada por las bacterias que constituyen la flora intestinal, del mismo modo que los oligosacáridos presentes en la leche humana estimulan el crecimiento de bifidobacterias en bebés alimentados con leche materna. Desde los años 50, este carbohidrato se utiliza en farmacia como

laxante y también se ha usado como un ingrediente prebiótico (Méndez y Olano, 1979; Schuman, 2002).

3.1. Obtención de oligosacáridos a partir de la hidrólisis y transglucosilación de la lactulosa

Actualmente existe un gran interés en la obtención de nuevos carbohidratos con propiedades prebióticas mejoradas. Como se ha comentado anteriormente, la lactulosa es resistente a la acción de las enzimas digestivas y presenta unas reconocidas propiedades prebióticas, sin embargo, es sustrato de la microflora en los primeros tramos del colon (Bown y col., 1974) y no alcanza las zonas más distales donde es mayor la incidencia de determinadas patologías. Por tanto, es de interés disponer de oligosacáridos derivados de la lactulosa capaces de llegar intactos a dichas zonas. En nuestro grupo de investigación se planteó la posibilidad de obtener oligosacáridos derivados de la lactulosa mediante transglucosilación con β -galactosidasas, abriendo, por lo tanto, nuevas perspectivas para la elaboración de nuevos carbohidratos prebióticos. Se llevó a cabo un estudio sobre la síntesis e identificación de los principales oligosacáridos formados durante la hidrólisis enzimática de la lactulosa con el preparado comercial Lactozym 3000 L HP G (Martínez-Villaluenga y col., 2008b). El análisis por cromatografía de intercambio aniónico y detección amperométrica de pulsos (HPAEC-PAD) mostró la formación de dos compuestos mayoritarios y en las mismas proporciones, el análisis por espectrometría de masas (EM) y resonancia magnética nuclear (RMN) permitió determinar la estructura química de estos dos nuevos oligosacáridos derivados de la lactulosa, siendo uno de ellos la 6' galactosil lactulosa (β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Fru) y el otro la 1 galactosil lactulosa (β -D-Gal(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Fru (1 $\rightarrow$ 1)- β -D-Gal), en las figuras 2 y 3 se muestran las estructuras correspondientes. Ha sido la primera vez

que se describe en la bibliografía un galactooligosacárido con el enlace glicosídico β (1 $\rightarrow$ 1).

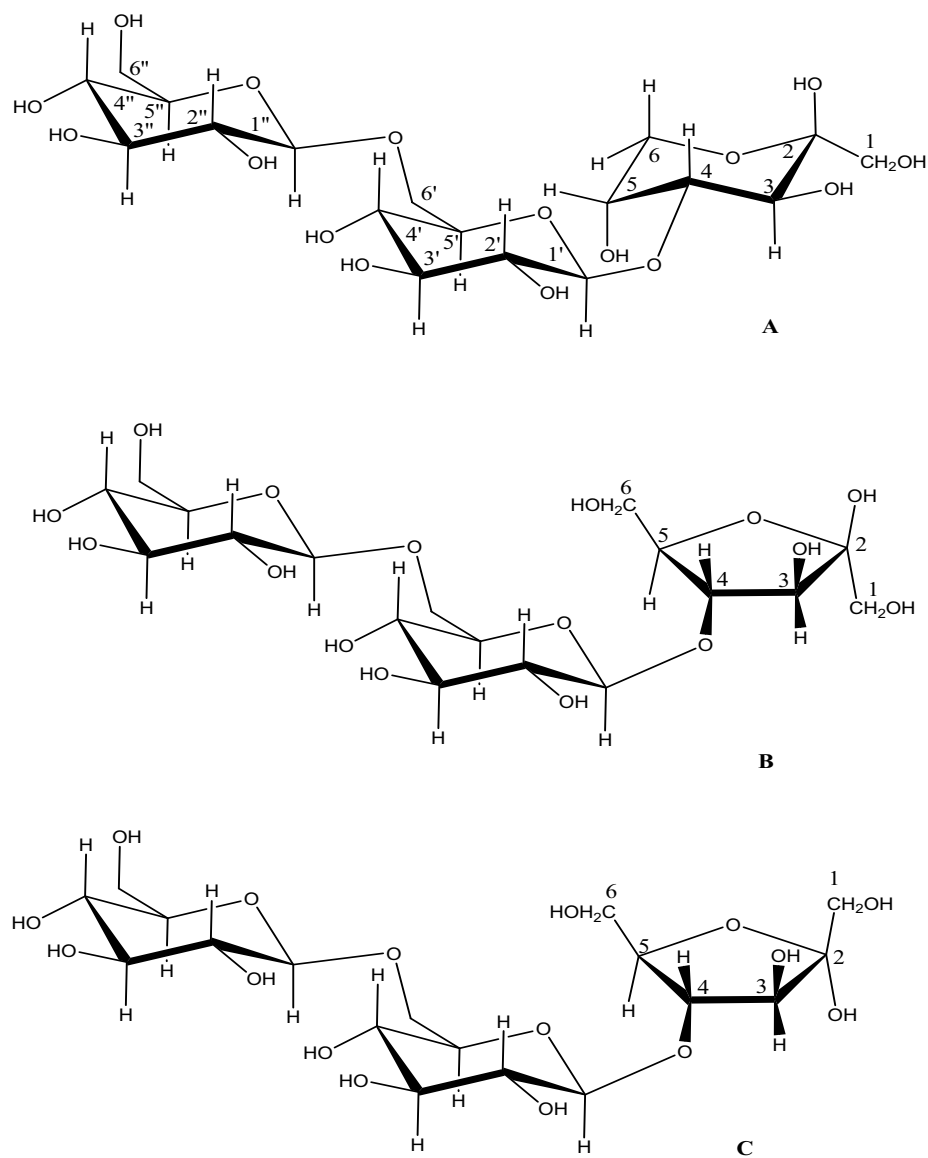


Figura 2.- Estructuras de los isómeros de la 6' galactosil lactulosa:
(A): β -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-fructopiranososa;
(B): β -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-fructofuranosa;
(C): β -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-fructofuranosa.

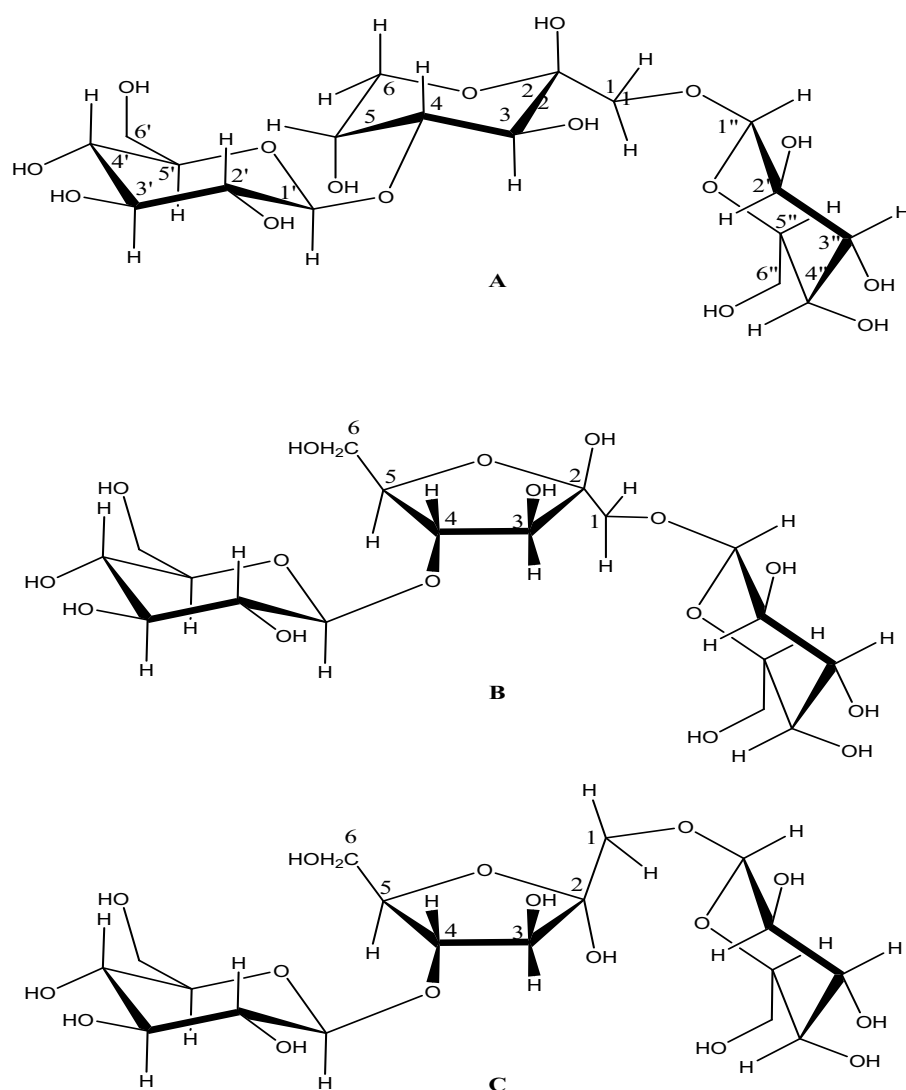


Figura 3. Estructuras de los isómeros del 1 galactosil lactulosa:
 (A): β -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-fructopiranosil-(1 $\rightarrow$ 1)- β -D-galactopiranosil;
 (B): β -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-fructofuranosil-(1 $\rightarrow$ 1)- β -D-galactopiranosil;
 (C): β -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-fructofuranosil-(1 $\rightarrow$ 1)- β -D-galactopiranosil.

Varios trabajos han demostrado que la propiedad de los prebióticos de estimular selectivamente el crecimiento de determinados microorganismos probióticos depende fundamentalmente de los enlaces glicosídicos presentes en sus estructuras y de los pesos moleculares. Los GOS que presentan enlaces β (1 $\rightarrow$ 6) son selectivos para

bifidobacterias (Rowland y Tanaka, 1993), sin embargo no se tiene información de los oligosacáridos derivados de la lactulosa con enlaces β (1 $\rightarrow$ 1). Además, en general, los carbohidratos con un grado de polimerización de 3, muestran una mayor selectividad hacia bifidobacterias (Kaneko y col., 1994; Kaplan y Hutkins, 2000). En base a lo mencionado anteriormente, la 6' galactosil lactulosa y la 1 galactosil lactulosa podrían ser considerados como potenciales prebióticos ya que al tener mayor peso molecular que la lactulosa pueden ser fermentados más lentamente y alcanzar regiones más distales del colon. Cardelle-Cobas y col., (2008b) realizaron un estudio exhaustivo de la influencia de diferentes parámetros, tiempo, temperatura, concentración de enzima y de sustrato en la formación de oligosacáridos, durante la hidrólisis de la lactulosa, mediante la actividad β -galactosidasa del preparado comercial Pectinex Ultra SP-L. El oligosacárido mayoritario formado resultó ser la 6' galactosil lactulosa además de formarse una serie de disacáridos (6 galactobiosa) y otros oligosacáridos no identificados con un grado de polimerización ≥ 3 . La velocidad de hidrólisis de la lactulosa aumentó con la temperatura (en el intervalo de 40-60 °C) así como la formación de productos de transglicosilación. Por otra parte, se observó la influencia del pH (figura 4) en la composición de los oligosacáridos; así a pH 4,5-5,5 se favorece la formación de disacáridos, mientras que a mayor pH (6,5) se favorece la síntesis de 6' galactosil lactulosa.

3.2. Obtención de oligosacáridos mediante isomerización de GOS.

Debido a que los carbohidratos en forma de aldosa pueden ser isomerizados en condiciones básicas a sus correspondientes cetosas, es posible modificar las características de fermentación de los oligosacáridos prebióticos mediante el desarrollo de procesos de conversión, económicamente factibles.

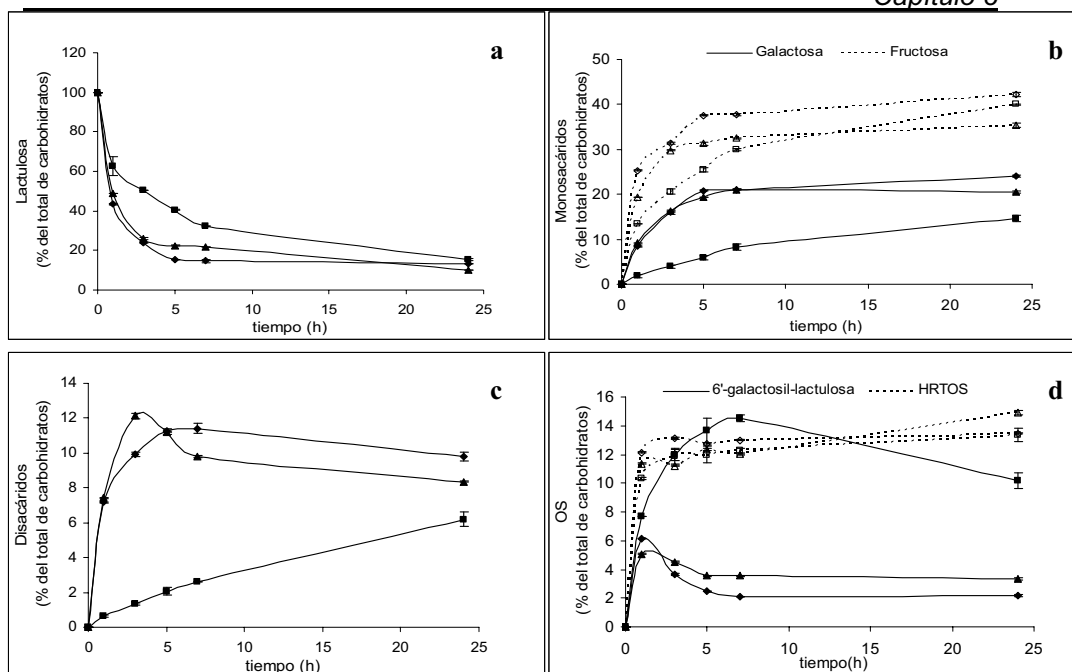


Figura 4.- Efecto del pH en la producción de oligosacáridos durante la hidrólisis enzimática de lactulosa (650 g/L) con Pectinex Ultra SP-L (16 U/mL) a 60°C. (♦) pH 4.5 (▲) pH 5.5 (■) pH 6.5. HRTOS: galactooligosacáridos no identificados. OS: oligosacáridos.

La lactosa en medio básico se convierte en lactulosa, por isomerización de la glucosa a fructosa con unos rendimientos muy altos (70-80%), usando catalizadores tales como hidróxido de aluminio (Aider y de Halleux, 2007). Los GOS son carbohidratos reductores susceptibles de ser isomerizados igualmente por su glucosa terminal dando lugar a un nuevo tipo de carbohidrato prebiótico que presente diferentes características de fermentación.

Nuestro grupo de investigación (Cardelle-Cobas y col., 2008c) ha optimizado las condiciones de isomerización de los GOS obtenidos mediante tratamiento enzimático de la lactosa con el preparado comercial Lactozym 3000 L HP G. La isomerización se realizó utilizando distintas cantidades de aluminato sódico como catalizador, en diferentes condiciones de temperatura y tiempo de reacción eligiendo aquellas en las que se obtiene un mayor rendimiento de GOS isomerizados.

En la figura 5 quedan reflejados los cromatogramas obtenidos del análisis por HPAEC-PAD de los productos resultantes de la hidrólisis y transglucosilación de la lactosa (A) y

del posterior tratamiento con aluminato sódico (B). Como consecuencia de la hidrólisis/transglicosilación pueden observarse los picos correspondientes a la galactosa (nº 1), glucosa (nº 2), y lactosa (nº 5). Asimismo, pueden observarse otros picos que corresponden a los GOS formados mediante la transglicosilación como son la 6 galactobiosa (nº 3); alolactosa (nº4); 4 galactobiosa (β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Gal) (nº 6) y 6' galactosil-lactosa (nº 7).

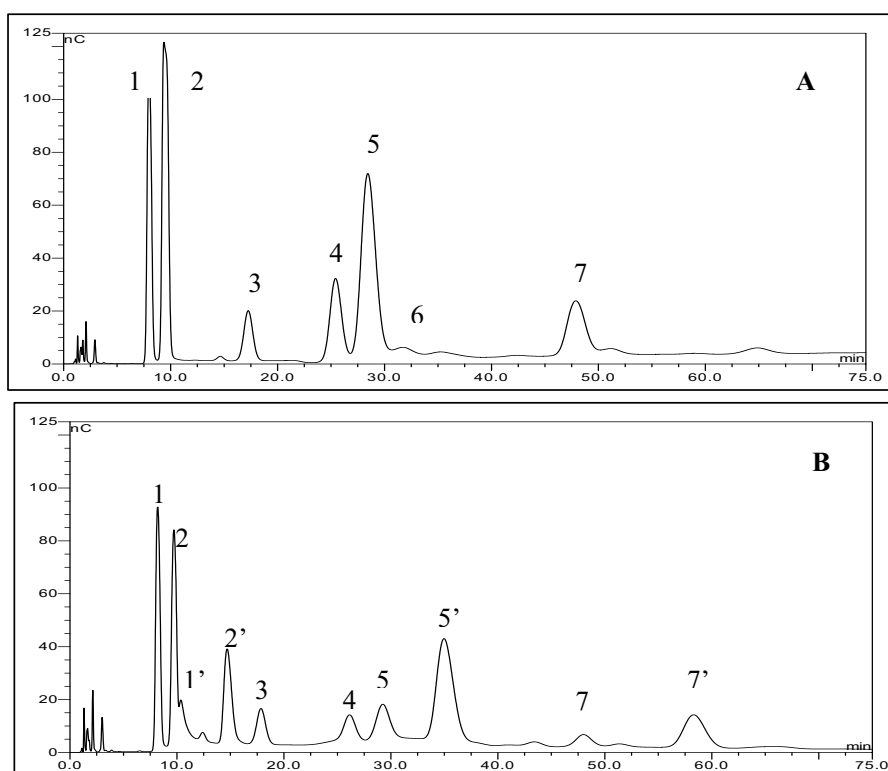


Figura 5.- Perfiles obtenidos del análisis por HPAEC-PAD de una mezcla de carbohidratos resultante de la hidrólisis de la lactosa con β -galactosidasa (Lactozym 3000 L HP G) antes (A) y después de nueve horas de isomerización a 40°C con una relación molar aluminato sódico/ lactosa 3:1 (B). 1: Galactosa, 2: Glucosa, 3: 6 Galactobiosa (β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 6)-D-Gal), 4: Alolactosa (β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 6)-D-Glc), 5: Lactosa, 6: 4 Galactobiosa (β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Gal), 7: 6'-galactosil lactosa (β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 6)-Lac), 1': Tagatosa, 2': Fructosa, 5': Lactulosa y 7': 6'-galactosil lactulosa (β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 6)-D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)-Fru).

En el punto óptimo de la reacción enzimática el producto resultante estaba constituido por monosacáridos (35%), alolactosa (11%), 6 galactobiosa (5%), lactosa (31%) y 6' galactosil lactosa (16%).

El tratamiento de esta mezcla de GOS con aluminato sódico dio lugar a la isomerización de todos los carbohidratos presentes en la mezcla, así lactosa, glucosa y galactosa se isomerizaron a lactulosa, fructosa y tagatosa, respectivamente, apareciendo un nuevo carbohidrato en la región de los trisacáridos, el cual fue aislado y caracterizado por RMN y EM, correspondiendo al trisacárido 6' galactosil lactulosa. Se optimizaron las condiciones de isomerización de los GOS realizando la reacción a diferentes temperaturas y con distintas concentraciones de aluminato sódico; en la figura 6 quedan reflejados los porcentajes para cada una de las cetosas formadas cuando la reacción se lleva a cabo a 40°C durante 24 horas. En las condiciones óptimas de reacción, 40°C durante 9h y una relación molar de aluminato sódico/lactosa 3/1, el rendimiento de la reacción de isomerización fue del 60% y la cantidad de carbohidratos finales cercana al 90% del producto inicial. Como ha podido demostrarse durante la isomerización de los GOS, además de los nuevos GOS formados, también se redujo considerablemente el contenido en lactosa, glucosa y galactosa, azúcares no recomendados para la población con problemas de diabetes o intolerancia a la lactosa.

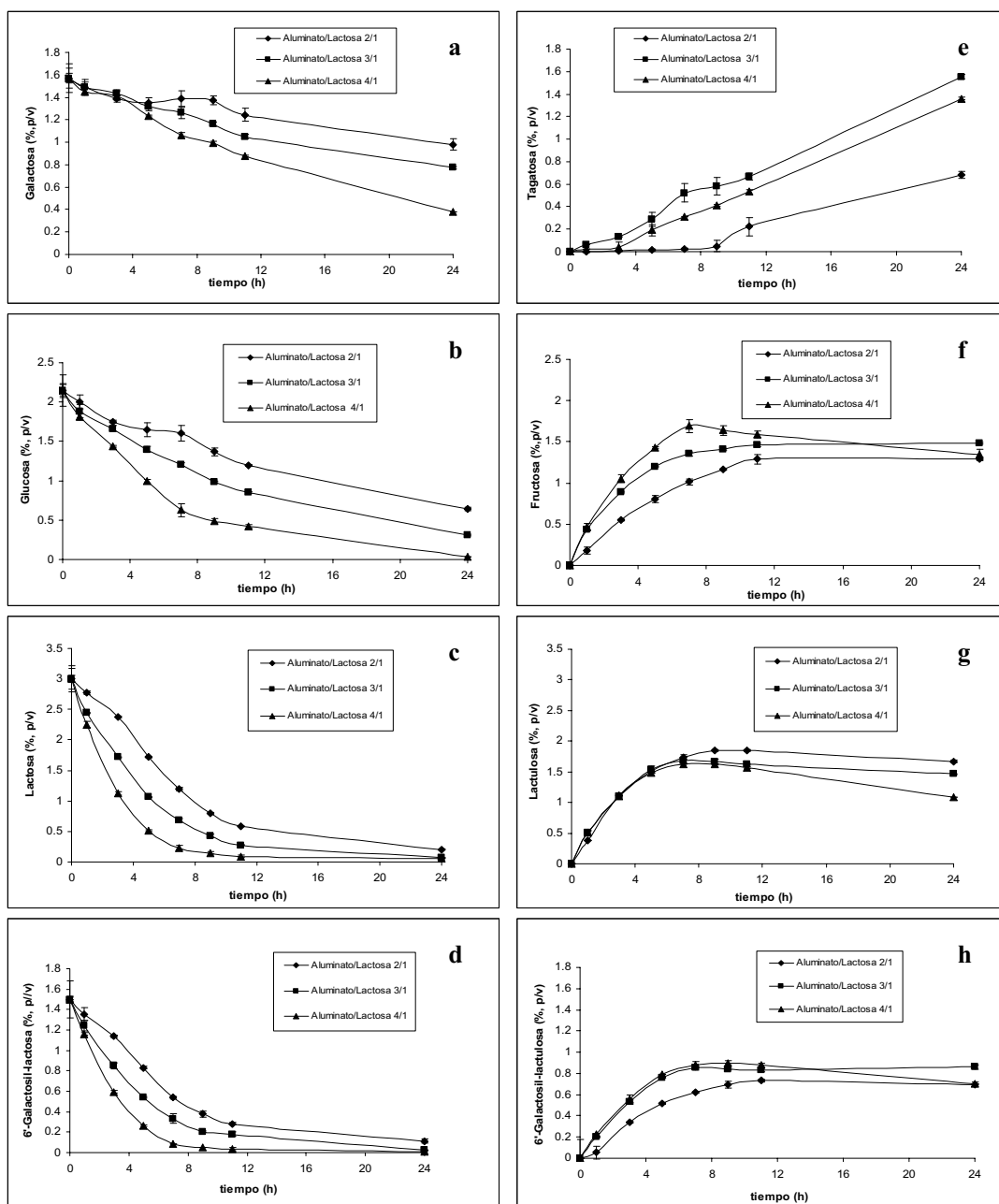


Figura 6.- Efecto del contenido en aluminato sódico en la isomerización de hidrolizados enzimáticos de lactosa a 40° C durante 24 h de reacción.

Conclusiones

Los oligosacáridos derivados de la lactosa pueden ser considerados como ingredientes que presentan un amplio rango de beneficios nutricionales particularmente centrados en promover la salud intestinal. Existe un amplio número de trabajos que avalan este hecho, sin embargo se debe profundizar en la búsqueda de un punto : nuevos oligosacáridos con propiedades prebióticas complementarias

Una de las vías podría ser la utilización de β -galactosidasas de diferentes orígenes para producir oligosacáridos derivados de la lactulosa así como la isomerización de carbohidratos prebióticos reductores.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por diferentes proyectos de investigación: CYTED N° XI.24; ALIBIRD S-0505/AGR/000153 de la Comunidad de Madrid y CONSOLIDER Ingenio 2010 (FUN-C-FOOD) CSD 2007-00063 del Ministerio de Educación y Ciencia.

Referencias

- Adachi, S., Patton, S. (1961). Presence and significance of lactulose in milk products: A review. *Journal of Dairy Science*, 44, 8, 1375-1393.
- Aider, M., de Halleux, D. (2007). Isomerization of lactose and lactulose production: review. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 356-364.
- Bode, L. (2006). Recent advances on structure, metabolism and function of human milk oligosaccharides. *Journal of Nutrition*, 136, 2127-2130.
- Boon, M. A., Janssen, A. E. M., van't Riet, K. (2000). Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 271-281.
- Bown, R. L., Gibson, J. A., Sladen, G. E., Hicks, B., Dawson, A. M. (1974). Effects of lactulose and other laxatives on ileal and colonic pH as measured by a radiotelemetry device. *Gut*, 15, 999-1004.
- Bridiau, N., Taboubi, S., Marzouki, N., Legoy, M. D., Maugard, T. (2006). β -Galactosidase catalyzed selective galactosylation of aromatic compounds. *Biotechnology Progress*, 22, 326-330.
- Cardelle-Cobas, A., Villamiel, M., Olano, A., Corzo, N. (2008 a). Study of galacto-oligosaccharides formation from lactose using Pectinex-Ultra SP-L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 954-961.
- Cardelle-Cobas, A., Martínez Villaluenga, C., Villamiel, M., Olano, A., Corzo, N. (2008 b). Synthesis of oligosaccharides derived from lactulose and Pectinex Ultra SP-L. *Journal of the Agriculture and Food Chemistry*, 56, 3328-3333.
- Cardelle-Cobas, A., Villamiel, M., Olano, A., Corzo, N. (2008 c). Isomerization of lactose-derived oligosaccharides: a case study using sodium aluminate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10954-10959.
- Cheng, C. C., Yu, M. C., Cheng, T. C., Sheu, D. C., Duan, K. J., Tai, W. L. (2006). Production of high-content galacto-oligosaccharide by enzyme catalysis and fermentation with *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters*, 28, 793-797.
- Chockchaisawasdee, S., Athanasopoulos, V. I., Niranjana, K., Rastall, R. A. (2005). Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 89, 434-443.
- Delzenne, N. M. (2003). Oligosaccharides: state of the art. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, 177-182.

- Finch, P., Yoon, J. H. (1997). The effects of organic solvents on the synthesis of galactose disaccharides using beta-galactosidases. *Carbohydrate Research*, 303, 339-345.
- García Peris, P., Velasco Gimeno, C. (2007). Evolución en el conocimiento de la fibra. *Nutrición Hospitalaria*, 22 Supl. 2, 5-20.
- Gaur, R., Pant, H., Jain, R., Khare, S. K. (2006). Galacto-oligosaccharides synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Food Chemistry*, 97, 426-430.
- Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota.-Introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125, 1401-1412.
- Goulas, A., Tzortzis, G., Gibson, G. R. (2007). Development of a process for the production and purification of α and β -galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *International Dairy Journal*, 17, 648-656.
- Hung, M. N., Lee, B. H. (2002). Purification and characterization of a recombinant β -galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 439-445.
- Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G., Vicaria, J. M. (2004). Kinetic models of activity for β -galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 33-40.
- Kaneko, T., Kohmoto, T., Kikuchi, H., Shiota, M., Iino, H., Mitsuoka, T. (1994). Effects of isomaltooligosaccharides with different degrees of polymerization on human faecal bifidobacteria. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 58, 2288-2290.
- Kaplan, H., Hutkins, R. W. (2000). Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2682-2684.
- Kozempel, M. F., Kurantz M. J., Craig, J. C., Hicks, K. B. (1995). Development of a continuous lactulose process: Separation and purification. *Biotechnology Progress*, 11, 592-595.
- Mahoney, R.R. (1998). Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food Chemistry*, 63, 147-154.
- Martínez-Villaluenga, C., Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Olano, A., Villamiel, M. (2008 a). Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G). *Food Chemistry*, 258-264.
- Martínez-Villaluenga, C., Cardelle-Cobas, A., Olano, A., Corzo, N., Villamiel, M., Jimeno, M. L. (2008 b). Enzymatic synthesis and identification of two trisaccharides

- p produced from lactulose by transgalactosylation.
- Journal of Agricultural and Food Chemistry*
- , 56, 557-563.
- Maugard, T., Gaunt, D., Legoy, M. D., Besson, T. (2003). Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology Letters*, 25, 623-629.
- Mendez, A., Olano, A. (1979). Lactulose. A review of some chemical properties and applications in infant nutrition and medicine. *Dairy Science. Abstracts*, 41, 9, 531-535.
- Miller, J. N., Whistler, R. L. (2000). Carbohydrates. In *Food Chemistry*, Fennema O (ed). Marcel Dekker, New York, USA, pp 207.
- Montgomery, E.M., Hudson, C.S. (1930). Relations between rotatory power and structure in the sugar group. XXVII. Synthesis of a new disaccharide ketose (lactulose) from lactose. *Journal of the American Chemical Society*, 52, 2101-2106.
- Palframan, R., Gibson, G. R., Rastall, R. A. (2003). Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 281-284.
- Panesar, P. S., Panesar, R., Singh, R. S., Kennedy, J.F., Kumar, H. (2006). Review: Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 530-543.
- Petuely, F. (1957). *Lactobacillus bifidus* flora produced in artificially-fed infants by bifidogenic substances (bifidus factor). *Z. Kinderheilk*, 79, 174-179.
- Prenosil, J. E., Stuker, E., Bourne, J. R. (1987). Formation of oligosaccharides during enzymatic hydrolysis of lactose. Part 1: State of the art. *Biotechnology and Bioengineering*, 30, 1019-1025.
- Roberfroid, M. (2003). Los prebióticos: concepto, criterio y propiedades nutricionales. *Nutrición Hospitalaria*, 18 (5) 273.
- Rowland I. R., Tanaka, R. (1993). The effects of transgalactosylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with human faecal microflora. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 667-674.
- Roy, I., Gupta, M. N. (2003). Lactose hydrolysis by Lactozym TM immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. *Process Biochemistry*, 39, 325-332.
- Ruttloff, H., Taufel, A., Krause, W., Haenel, H., Taufel, K. (1967). The intestinal enzymatic decomposition of galacto-oligosaccharides in the human and animal intestine, with particular regard to *Lactobacillus bifidus*. Part 2. On the intestinal behaviour of lactulose. *Nahrung*, 11, 39-46.

- Sako, T., Matsumoto, K., Tanaka R. (1999). Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *Internacional Dairy Journal*, 9, 69-80.
- Sanz, M. L., Gibson, G. R., Rastall, R. A. (2005). Influence of disaccharide structure on prebiotic selectivity in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5192-5199.
- Sears, P., Wong, C. H. (2001). Toward automated synthesis of oligosaccharides and glycoproteins. *Science*, 291, 2344-2350.
- Splechtna, B., Nguyen, T. H., Steinböck, M., Kulbe, K. D., Lorenz, W., Haltrich, D. (2006). Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using β -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4999-5006.
- Schumann, C. (2002). Medical, nutritional and technological properties of lactulose. An update. *European Journal of Nutrition*, 41, 17-25
- Tuohy, K. M., Rouzaud, G. C. M., Brück, W. M., Gibson, G. R. (2005). Modulation of the human gut flora towards improved health using prebiotics – *Assesment of efficacy*. *Current Pharmaceutical Design*, 11, 75-90.
- Tzortzis, G., Goulas, A. K., Gibson, G. R. (2005). Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 412-416.
- Yoon, J. H., McKenzie, D. (2005). A comparison of the activities of three beta-galactosidases in aqueous-organic solvent mixtures. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 439-446.

Obtención de seroproteínas funcionales vía reacción de Maillard.

Mar Villamiel, Rosina López-Fandiño, Ana Cristina Soria, Marta Corzo-Martínez y F. Javier Moreno

Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC). C/ Juan de la Cierva, 3 28006 Madrid

Tel. 915622900 Fax 915644853

mvillamiel@ifi.csic.es

j.moreno@ifi.csic.es

rosina@ifi.csic.es

acsoria@ifi.csic.es

mcorzo@ifi.csic.es

1. Introducción

Las proteínas del suero lácteo o seroproteínas son ampliamente utilizadas en el sector agroalimentario, ocupando un lugar preponderante en una frontera emergente, donde confluyen la nutrición y la salud. Considerado en el pasado como un subproducto de escasa importancia, el lactosuero es, en la actualidad, uno de los ingredientes más valorados tanto por el valor nutricional de sus componentes como por la funcionalidad de los mismos, hecho al que han contribuido de forma notable los avances sobre las técnicas de filtración por membranas para el fraccionamiento y purificación de sus constituyentes y, en particular, de las proteínas (Onwulata, 2008).

Las seroproteínas (α -lactoalbúmina (α -La), β -lactoglobulina (β -Lg), seroalbúmina bovina (BSA), lactoferrina, lactoperoxidasa, inmunoglobulinas y otras proteínas minoritarias) representan aproximadamente el 20% de las proteínas de la leche de vaca y se definen como aquéllas que se mantienen en disolución tras la precipitación ácida (Walstra y Genes, 1984) o enzimática (Barth y Behnke, 1997) de las caseínas durante la elaboración del queso. Estas proteínas, con alto contenido en amino ácidos esenciales, son responsables de la funcionalidad tanto biológica como tecnológica del lactosuero y se emplean como ingredientes en productos lácteos, cárnicos, derivados de cereales, bebidas derivadas de frutas, salsas, sopas, pasta, suplementos dietéticos y bebidas para deportistas (Foegeding y col., 2002), por las

propiedades físico-químicas que poseen, tales como solubilidad, viscosidad, capacidad de retención de agua, y por sus propiedades tecnológicas como agentes gelificantes, emulsionantes y espumantes (Christiansen y col., 2004; Neiryck y col., 2004; Firebaugh y Daubert, 2005; Herceg y col., 2007). Además, merece ser destacada la funcionalidad biológica tanto de ciertas proteínas del suero como de sus péptidos derivados, ya que pueden llegar a tener actividad como antioxidantes, antihipertensivos, antitumorales, hipolipidémicos, antivirales, bactericidas y agentes quelantes (Marshall, 2004).

A pesar de las propiedades beneficiosas de las seroproteínas, uno de los objetivos de la industria del sector lácteo es la mejora de las mismas para incrementar su rango de aplicación y, así, acercarse a las necesidades requeridas por el consumidor actual. Como es sabido, tanto las propiedades nutricionales como la funcionalidad de las seroproteínas se encuentran directamente relacionadas con su composición aminoacídica y con sus ordenadas estructuras secundaria y terciaria (Fox, 2003). De este modo, modificaciones en parámetros moleculares importantes tales como la carga, la masa, la hidrofobicidad y la conformación pueden provocar cambios notables en la funcionalidad de dichas proteínas. Existe una gran diversidad de tratamientos encaminados a la modificación de dichas características moleculares, como por ejemplo, los métodos físicos, enzimáticos y/o químicos (acetilación, desaminación, succinilación, alquilación reductora, etc.). Entre los últimos, se ha prestado especial atención al efecto que ejercen los azúcares reductores sobre la funcionalidad y estructura de las proteínas, existiendo evidencias importantes de que la interacción covalente entre los grupos amino de las proteínas con el carbonilo de los azúcares reductores vía reacción de Maillard (RM), es uno de los métodos más efectivos para obtener nuevas proteínas modificadas con gran interés tecnológico (Oliver y col., 2006). Además, a diferencia de otros métodos químicos utilizados para

el mismo fin, la glicosilación vía RM o glicosilación no enzimática, no implica la utilización de reactivos tóxicos para el consumo humano.

La RM es una de las reacciones más complejas e importantes que ocurren durante el procesado y conservación de los alimentos y, junto con la caramelización, es la responsable del pardeamiento no enzimático (Villamiel y col., 2006). Desde que fuera descubierta por Maillard en 1912, ha sido ampliamente estudiada por la gran cantidad y complejidad de los productos formados durante sus etapas iniciales, intermedias y finales (Martins y col., 2001). Durante el avance de esta reacción se originan compuestos de muy diferente naturaleza que pueden llegar incluso a interaccionar con los reactantes iniciales, además de producirse alteraciones importantes en la estructura y, consecuentemente, en la funcionalidad de las proteínas. En este sentido, a diferencia de las etapas iniciales de la reacción, las etapas intermedias y finales son las que contribuyen a un mayor entrecruzamiento en las proteínas y una mayor formación de compuestos coloreados y fluorescentes, incluso con potencialidad mutagénica (Oliver y col., 2006). Por todo ello, en función del fin que se persiga, es preciso controlar el avance de la RM seleccionando las condiciones más adecuadas tales como la actividad de agua, la temperatura, el tiempo, el pH, la proporción entre los grupos amino y carbonilo y las propiedades intrínsecas de los reactivos (van Boekel, 2001).

2. Efecto de la glicosilación vía reacción de Maillard sobre la funcionalidad de las seroproteínas

2.1. Efecto sobre las propiedades tecnológicas

Hasta el momento se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la obtención deliberada de glicoconjugados vía RM con proteínas de diferente origen y carbohidratos de distinta naturaleza y peso molecular. Esta interacción covalente provoca modificaciones en la carga, la solvatación y/o conformación de las proteínas,

pudiendo modificar su funcionalidad tecnológica y biológica. Muchos de estos estudios se han realizado en las seroproteínas y, sobre todo, en la β -Lg, ya que la funcionalidad del suero lácteo viene determinada principalmente por la de esta proteína mayoritaria, siendo la α -La la siguiente en abundancia (50 y 25% de su fracción proteica, respectivamente) (Kontopidis y col., 2004; Considine y col., 2007).

Varios autores han estudiado la interacción de la β -Lg vía RM, bajo condiciones controladas, con distintos mono-, di- y oligosacáridos. La unión covalente de carbohidratos a la proteína provoca una pérdida en la carga positiva, resultando en un cambio en el perfil de solubilidad de la proteína en función del pH y del tratamiento térmico (Haertlé y Chobert, 1999). Se han obtenido glicoconjugados de la β -Lg con glucosa, glucosa-6-fosfato, galactosa, manosa, ribosa, arabinosa, gliceraldehído, lactosa y oligofructosa con una mejor solubilidad, capacidad emulgente y espumante y estabilidad térmica, respecto a la proteína original (Nacka y col., 1998; Bouhallab y col., 1999; Groubet y col., 1999; Morgan y col., 1999a, 1999b; Chevalier y col., 2001a; Fenaille y col., 2003; Trofinova y Jongh, 2004). La gelificación es otra de las propiedades funcionales de las seroproteínas que puede verse mejorada tras su glicosilación no enzimática con monosacáridos. En este caso interesa que la RM progrese hacia estados más avanzados para favorecer un mayor entrecruzamiento y agregación de las proteínas (Rich y Foegeding, 2000).

Las modificaciones en la capacidad emulgente han sido profusamente estudiadas en glicoconjugados cuando se emplean polisacáridos de alto peso molecular. En general, la unión covalente de polisacáridos a las proteínas mejora la funcionalidad proteica ya que combina las propiedades emulsionantes de las proteínas con el papel estabilizador de los polisacáridos (Dickinson y Galazka, 1991). A pesar de que esta unión se encuentra más limitada que la de los oligosacáridos debido al impedimento estérico que ejercen las cadenas de carbohidratos, la conjugación de

proteínas con polisacáridos puede afectar en mayor medida a la funcionalidad, debido especialmente a su elevada hidrofilia. Además, se exponen zonas hidrofóbicas superficiales de las proteínas mejorando a la vez la adsorción en las interfases y aumentando la flexibilidad de las moléculas de proteína. Esto favorece su interacción con la fase oleosa cuando se forma una emulsión, mientras que la cadena polisacáridica queda expuesta hacia la fase acuosa, impidiendo la coalescencia de las gotas de aceite (Figura 1) (Nagasawa y col., 1996). Además, la menor reactividad de los polisacáridos impide un mayor avance de la RM lo que se traduce en menor desarrollo de color y menor incidencia de reacciones secundarias (Kato, 2002).

Varias son las investigaciones que han abordado la formación de glicoconjugados entre seroproteínas y dextrano vía RM. El interés de la utilización de este polisacárido reside en su estructura, ya que se trata de una cadena glucosídica lineal mayoritariamente con uniones $\alpha(1\rightarrow6)$ y con algunas ramificaciones $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ y $\alpha(1\rightarrow4)$. El alto porcentaje de uniones $\alpha(1\rightarrow6)$ que posee el dextrano le confiere una alta flexibilidad, solubilidad y baja viscosidad en disolución.

Dunlap y Côté (2005) examinaron el efecto del tamaño del polisacárido en la

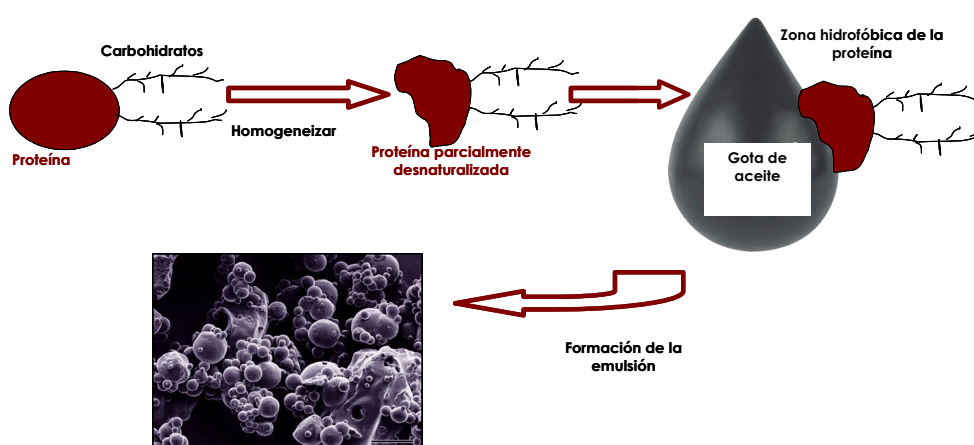


Figura 1. Esquema de la formación de una emulsión empleando proteínas glicosiladas con polisacáridos.

estabilidad de la emulsión cuando se conjugaba la β -Lg con dextranos de 19.6-2000 kDa y encontraron que, en general, al aumentar el peso molecular del dextrano se incrementaba también la estabilidad de la emulsión en las condiciones ensayadas, hasta pesos moleculares de 150 kDa. Wooster y Augustin (2006) también estudiaron la influencia del peso molecular del polisacárido (18.5-440 kDa) en la estabilidad de la emulsión cuando se empleaban como agentes emulgentes los conjugados β -Lg-dextrano obtenidos vía RM. La unión del dextrano, independientemente de su peso molecular, incrementó la estabilidad de la emulsión frente a la floculación inducida por calcio. La capacidad emulgente también se vio mejorada en glicoconjugados aislados de proteína de suero (WPI) con dextrano de 35 y 70 kDa por los mismos autores (Wooster y Augustin, 2007), quienes atribuyeron el efecto positivo en esta propiedad al desdoblamiento de la proteína y, consecuentemente, a la pérdida de rigidez de la misma durante el avance de la reacción en los casos de moderados niveles de conjugación proteína-carbohidrato.

Asimismo, se han hallado resultados importantes en conjugados obtenidos vía RM empleando galactomanano, que es otro de los polisacáridos a considerar, no sólo por su relativamente alta solubilidad en agua sino también por su disponibilidad y bajo coste, lo que hace que sea un estabilizante ampliamente utilizado como ingrediente alimentario. En este sentido, Kim y col. (2003) encontraron mejores índices de actividad emulgente y mejor estabilidad de la emulsión en conjugados BSA-galactomanano en comparación con la proteína sin glicosilar.

Otros estudios llevados a cabo empleando dextrano (10-43 kDa) han demostrado que las condiciones óptimas para interaccionar vía RM con la β -Lg, la α -La y la BSA son 60°C y 0.44 a_w , originándose glicoconjugados con mejor solubilidad que la proteína inicial. Las mejoras más notables en esta propiedad se alcanzaron a bajos valores de pH, probablemente debido a que la unión covalente del polisacárido

produce una disminución en el punto isoeléctrico de la proteína. La estabilidad térmica tanto de la β -Lg como de la BSA, que son las seroproteínas más termolábiles, también se mejoró por la unión con el dextrano. Estos autores indicaron que el efecto positivo de la unión del polisacárido a las proteínas en las propiedades estudiadas no estaba ligado al peso molecular del carbohidrato (Jiménez-Castaño y col., 2005a, b; Jiménez-Castaño y col., 2007). La figura 2, muestra, a modo de ejemplo, los resultados correspondientes a la β -Lg con dextrano de 10 y 20 KDa.

Recientemente, Zhu y col. (2008) han estudiado la formación vía RM de conjugados WPI-dextrano de 11 kDa en disoluciones acuosas a diferente temperatura y concentración, tanto de proteína como de carbohidrato. Estos autores observaron que los conjugados originados eran estables en las condiciones ensayadas, pero no llevaron a cabo ningún estudio sobre la influencia en la funcionalidad. Además, como es sabido, las condiciones óptimas para llevar a cabo la formación de estos productos de interacción implican bajos valores de a_w , ya que la RM se encuentra favorecida a la vez que las alteraciones importantes en la estructura proteica se ven minimizadas.

2.2. Efecto sobre las propiedades biológicas

La glicosilación de proteínas mediante RM no sólo puede mejorar determinadas características tecnológicas y sensoriales de los alimentos, sino que, además, podría proporcionar a las proteínas modificadas un valor biológico añadido, diversificando su funcionalidad y, por tanto, dotándolas de un mayor interés, como se muestra a continuación.

La modificación de las proteínas con azúcares fosforilados puede dar lugar a una serie de fosfopéptidos con capacidad de solubilizar el fosfato cálcico, evitando su precipitación y aumentando su absorción en el intestino (Sato y col., 1986). Debido a

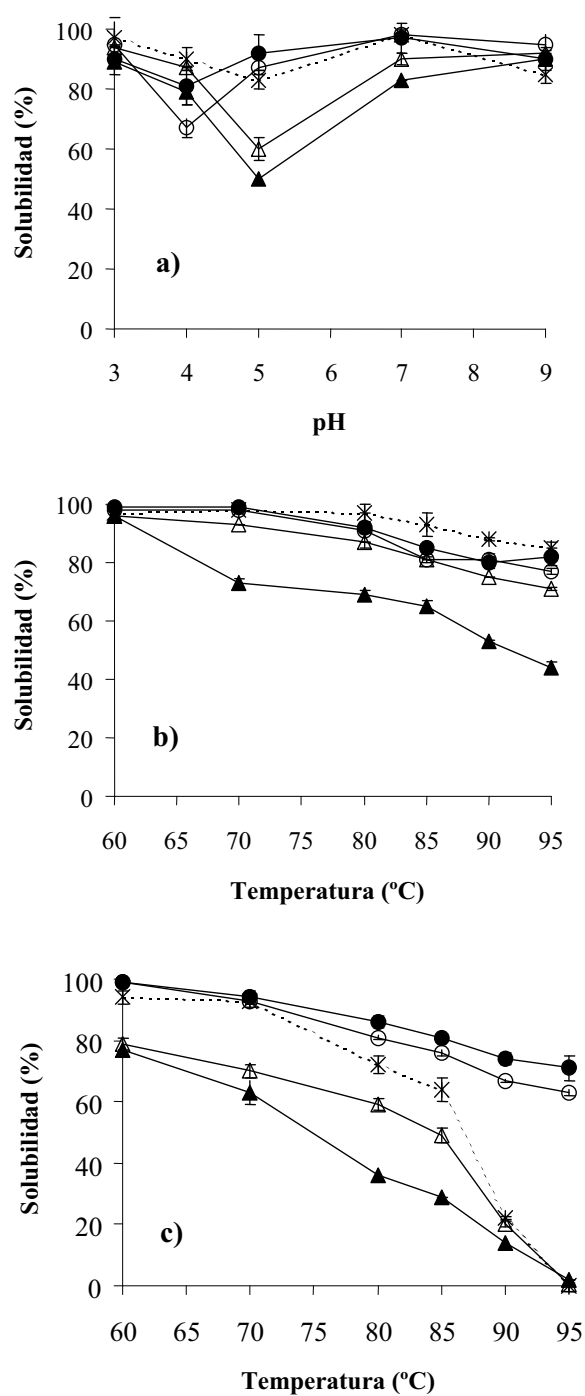


Figura 2. Solubilidad (a) y estabilidad térmica a pH 7 (b) y 5 (c) de la β -lactoglobulina nativa, calentada y glicosilada con dextrano (60°C y 0.44 a_w durante tiempos correspondientes a los máximos de glicosilación). (-x-) nativa; (△) calentada 36 h; (▲) calentada 60 h; (○) glicosilada con dextrano 10 kDa, 36 h; (●) glicosilada con dextrano 20 kDa, 60 h.

este hecho, se han atribuido a los fosfopéptidos una serie de aplicaciones potenciales, tales como la prevención de la osteoporosis, recalcificación de huesos después de posibles fracturas, prevención de la hipertensión y de la aparición de caries dental, etc. (FitzGerald, 1998). Aoki y col. (1997) demostraron que la glicosilación vía RM de la β -Lg con glucosa-6-fosfato producía un aumento en la solubilización del fosfato cálcico. Más recientemente, se han publicado una serie de trabajos que muestran un aumento en la solubilización del fosfato cálcico de un concentrado de proteínas de suero (Li y col., 2005), de la β -Lg (Enomoto y col., 2007) y de la BSA (Enomoto y col., 2008) tras su glicosilación no-enzimática con maltopentaosa y/o fosforilación con pirofosfato.

Otra propiedad beneficiosa que puede ser fomentada por la glicosilación de proteínas vía RM es la actividad antioxidante. Así, Browdy y Harris (1997) comprobaron que productos avanzados de la RM, derivados del calentamiento de sueros en polvo, retardaban la oxidación de los lípidos. Por otro lado, Alaiz y col. (1997) indicaron que la glicosilación no-enzimática de la BSA bovina con glucosa, fructosa y, especialmente, con ribosa dio lugar a compuestos pardos con actividad antioxidante. Chevalier y col. (2001b) también observaron que la β -Lg modificada con ribosa, arabinosa y, en menor medida, con ramnosa, galactosa, glucosa y lactosa poseía actividad captadora de radicales libres. Esta capacidad antioxidante es, generalmente, atribuida a la formación de pirroles, melanoidinas y heterociclos que tiene lugar durante las etapas avanzadas y finales de la RM (Lee y Shibamoto, 2002).

Como consecuencia de los efectos de la glicosilación en la conformación, la solubilidad y las propiedades interfaciales de las proteínas, es de esperar que su susceptibilidad a la proteólisis se vea alterada. Los cambios, tanto *in vitro* como *in vivo*, en la digestibilidad de las proteínas glicosiladas pueden tener importantes consecuencias en sus propiedades nutritivas y biológicas, al condicionar la producción de péptidos bioactivos y su absorción intestinal. Así, la BSA bovina glucosilada

no-enzimáticamente en condiciones pseudo-fisiológicas fue más resistente a la digestión con tripsina que la proteína nativa (Lapolla y col., 2001), debido probablemente a una menor reactividad de esta enzima frente a los residuos de Lys y Arg modificados (Henle y Klostermeyer, 1993; Morgan y col., 1997). Recientemente, Sanz y col. (2007) y Moreno y col. (2008) encontraron resultados similares con la β -Lg bovina glicosilada vía RM con galactooligosacáridos. Por el contrario, Bouhallab y col. (1999), en un estudio con la β -Lg lactosilada, observaron la formación de un estado dimérico estable, intermedio en el proceso de desnaturalización térmica, con una conformación, menos compacta y más expandida, muy susceptible a las enzimas proteolíticas.

Por otro lado, se ha descrito que la lactosa unida a la β -Lg a través de la RM es resistente a la acción de la β -galactosidasa, debido, principalmente, a la estructura compacta y globular que presentan los conjugados β -Lg-lactosa. Sin embargo, es posible lograr una mejor accesibilidad de la lactosa conjugada, mediante proteólisis o desnaturalización por calor de los conjugados antes de la adición de la β -galactosidasa (Morgan y col., 1999c).

También debe resaltarse que las proteínas glicosiladas vía RM pueden presentar propiedades inmunoquímicas alteradas que modifiquen su alergenicidad (Matsuda y col., 1985). La glicosilación no-enzimática de las proteínas podría influir en su alergenicidad por dos vías: i) a nivel de su absorción gastrointestinal, ya que se piensa que uno de los requisitos que debe cumplir una proteína alimentaria para ser alergénica es que su estructura tridimensional sea al menos parcialmente estable al entorno adverso del tracto gastrointestinal (acción hidrolítica de las proteasas digestivas, pH ácido, acción de surfactantes como sales biliares), conservando su actividad inmunológica una vez absorbidos a nivel de la mucosa intestinal (Metcalf y col., 1996); ii) a nivel estructural, como consecuencia de que la interacción con

azúcares pueda enmascarar los epítomos de los alérgenos y, por tanto, reducir su alergenicidad (Kato, 2002). Los alérgenos más importantes del lactosuero son la β -Lg y la α -La (Wal, 2001). En una serie de trabajos, Hattori y col. realizaron inmunoensayos con β -Lg modificada con dextrano carboximetilado (1994), quitosano (2000) y oligosacáridos derivados del ácido alginico (2004) indicando que estos conjugados presentaban una menor antigenicidad e inmunogenicidad que la β -Lg nativa. Enomoto y col. (2007; 2008) también lograron reducir parcialmente la inmunogenicidad de la β -Lg y BSA tras su conjugación con maltopentaosa.

Finalmente, también se ha estudiado el posible efecto antimicrobiano de los productos derivados de la RM de la β -Lg con diversos carbohidratos y quitosanos con resultados dispares. Mientras que Chevalier y col. (2001b) no encontraron ningún efecto inhibitor de la β -Lg glicosilada con pentosas (ribosa, arabinosa), hexosas (ramnosa, galactosa, glucosa) o disacáridos (lactosa) sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Listeria innocua* y *Streptococcus mutans*, Miralles y col. (2007) indicaron que la β -Lg conjugada vía RM con quitosanos durante 2 días a 40°C con una a_w de 0.79 presentó una actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* dos veces superior a la actividad presentada por el quitosano sin conjuguar. Aunque el mecanismo por el cual la glicosilación no-enzimática podría provocar un aumento de la actividad bactericida no está aún elucidado, se ha postulado que el desarrollo de la RM podría contribuir a un aumento de la carga neta positiva de los quitosanos. En este sentido, Babiker (2002) indicó que este aumento potencia la actividad antimicrobiana del quitosano frente a bacterias gram-negativas.

3. Conclusiones y tendencias futuras

La obtención de proteínas glicosiladas vía RM es un método eficaz para mejorar o incluso generar nuevas propiedades funcionales y biológicas, produciendo glicoconjugados de gran interés tecnológico. Asimismo, constituye una alternativa muy atractiva a la modificación de proteínas mediante la utilización de agentes químicos. Sin embargo, dada la complejidad de la RM, es necesario profundizar en el estudio de parámetros que permitan un control aún más exhaustivo de dicha reacción. En este sentido, el empleo de inhibidores de grado alimentario de las etapas más avanzadas de la RM, que pueden conducir a la formación de compuestos con cierta actividad mutagénica o citotóxica, combinado con la optimización de condiciones de calentamiento podría garantizar la inocuidad de los glicoconjugados obtenidos.

Por otra parte, no es menos importante el desarrollo de métodos industrialmente rentables que permitan la producción de glicoconjugados con una óptima funcionalidad y su inclusión como nuevos ingredientes en alimentos. Este punto es crítico si se desea transferir al mercado el potencial que presenta este tipo de glicoproteínas como nuevos ingredientes funcionales. Finalmente, un mayor conocimiento y control de los efectos del proceso de glicosilación no-enzimática sobre las propiedades estructurales de las seroproteínas permitiría tanto una producción más segura como el diseño de ingredientes con una funcionalidad más específica y, por tanto, más dirigida a satisfacer las demandas concretas del consumidor.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por diferentes proyectos de investigación: CYTED N° XI.24; ALIBIRD S-0505/AGR/000153 de la Comunidad de Madrid y CONSOLIDER Ingenio 2010 (FUN-C-FOOD):CSD 2007-00063 del Ministerio de Educación y Ciencia.

Referencias

- Alaiz, M., Hidalgo, F. J., Zamora, R. (1997). Comparative antioxidant activity of Maillard- and oxidized lipid-damaged bovine serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3250-3254
- Aoki, T., Kitahata, K., Fukumoto, T., Sugimoto, Y., Ibrahim, H. R., Kimura, T., Kato, Y., Matsuda, T. (1997). Improvement of functional properties of β -lactoglobulin by conjugation with glucose-6-phosphate through the Maillard reaction. *Food Research International*, 30, 401-406.
- Babiker, E. E. (2002) Effect of chitosan conjugation on the functional properties and bactericidal activity of gluten peptides. *Food Chemistry*, 79, 367-372.
- Barth, C.A., Behnke, U. (1997). Nutritional significance of whey and whey components *Nahrung*, 41, 2-12.
- Bouhallab, S, Morgan, F., Henry, G., Mollé, D., Léonil, J. (1999). Formation of covalent dimmer explains the high solubility at pH 4.6 of lactose- β -lactoglobulin conjugates heated near neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1489-1494.
- Browdy, A. A., Harris, N. D. (1997). Whey improves oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Science*, 62, 348-350
- Considine, T., Patel, H.A., Anema, S.G., Singh, H., Creamer, L. K. (2007). Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments. A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 1-23.
- Chevalier, F., Chobert, J.M., Molle, D., Haertlé, T. (2001a). Maillard glycation of β -lactoglobulin with several sugars: comparative study of the properties of the obtained polymers and of the substituted sites. *Lait*, 81, 651-666.
- Chevalier, F., Chobert, J.M., Genot, C., Haertlé, T. (2001b) Scavenging of free radicals, antimicrobial, and cytotoxic activities of the Maillard reaction products of β -lactoglobulin glycated with several sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5031-5038.
- Christiansen, K.F., Vegarud, G., Langsrud, T., Ellekjaer, M.R., Egelanddal, B. (2004). Hydrolyzed whey proteins as emulsifiers and stabilizers in high-pressure processed dressing. *Food Hydrocolloids*, 18, 757-767.
- Dickinson, E., Galazka, V.B. (1991) Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of β -lactoglobulin with polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 5, 281-296.
- Dunlap, C.A., Côté, G.L. (2005). β -lactoglobulin-dextran conjugates: effect of polysaccharide size on emulsion stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 419-423.

- Enomoto, H., Li, C.P., Morizane, K., Ibrahim, H.R., Sugimoto, Y., Ohki, S., Ohtomo, H., Aoki, T. (2007) Glycation and phosphorylation of β -lactoglobulin by dry-heating: effect on protein structure and some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2392-2398.
- Enomoto, H., Li, C.P., Morizane, K., Ibrahim, H.R., Sugimoto, Y., Ohki, S., Ohtomo, H., Aoki, T. (2008). Improvement of functional properties of bovine serum albumin through phosphorylation by dry-heating in the presence of pyrophosphate. *Journal of Food Science*, 73, C84-C91.
- Fenaille F., Morgan F., Parisod V., Tabet J-C., Guy, P.A. (2003). Solid-state glycation of β -lactoglobulin monitored by electrospray ionisation mass spectrometry and gel electrophoresis techniques. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 17, 1483-1492.
- Firebaugh, J.D., Daubert, C.R. (2005). Emulsifying and foaming properties of a derivatized whey protein ingredient. *International Journal of Food Properties*, 8, 243-253.
- FitzGerald, R. J. (1998). Potential uses of caseinophosphopeptides. *International Dairy Journal*, 8, 451-457.
- Foegeding, E.A., Davis, J.P., Doucet, D., McGuffey, M. K. (2002). Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 151-159.
- Fox, P.F. (2003). Milk proteins: general and historical aspects. In P.F. Fox, & P. McSweeney, *Advanced Dairy Chemistry (Vol. 1): Proteins, Part A*, 3rd edition. (pp 1-41). New York: Plenum Press.
- Groubet, R., Chobert, J-M., Haertlé, T. (1999). Functional properties of milk proteins glycosylated in mild conditions. *Sciences des Aliments*, 19, 423-438.
- Haertlé, T., Chobert, J.M. (1999). Recent progress in processing of dairy proteins: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 23, 367-407.
- Hattori, M., Nagasawa, K., Ametani, A., Kaminogawa, S., Takahashi, K. (1994). Functional changes in β -lactoglobulin by conjugation with carboxymethyl dextran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2120-2125.
- Hattori, M., Numamoto, K., Kobayashi, K., Takahashi, K. (2000). Functional changes in β -lactoglobulin by conjugation with cationic saccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2050-2056.

- Hattori, M., Miyakawa, S., Ohama, Y., Kawamura, H., Yoshida, T., To-O, K., Kuriki, T., Takahashi, K. (2004). Reduced immunogenicity of beta-lactoglobulin by conjugation with acidic oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4546-4553.
- Henle, T., Klostermeyer, H. (1993). The Reactivity of the Individual Protein-Bound Lysine Residues of β -Casein a1 During the Initial Stages of the Maillard Reaction. In *International Dairy Federation Special Issue 9303. Protein and Fat Globule Modifications by Heat Treatment, Homogenization, and Other Technological Means for High Quality Dairy Products*; International Dairy Federation: Brussels, Belgium, 1993; p. 183–189.
- Herceg, Z., Rezek, A., Lelas, V., Kresic, G. y Franetovic, M. (2007). Effect of carbohydrates on the emulsifying, foaming and freezing properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, 79, 279-286.
- Jiménez-Castaño, L., Villamiel, M., Martín-Alvárez, P.J., Olano, A., López-Fandiño, R. (2005a). Effect of the dry-heating conditions on the glycosylation of β -lactoglobulin with dextran through the Maillard reaction. *Food Hydrocolloids*, 19, 831-837.
- Jiménez-Castaño, L., López-Fandiño, R., Olano, A., Villamiel, M. (2005b). Study on β -lactoglobulin glycosylation with dextran: effect on solubility and heat stability. *Food Chemistry*, 93, 689-695.
- Jiménez-Castaño, L., Villamiel, M., López-Fandiño, R. (2007) Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass. *Food Hydrocolloids*, 21, 433-443.
- Kato, A. (2002) Industrial applications of Maillard-type protein-polysaccharide conjugates. *Food Science and Technology Research*, 8, 193-199.
- Kim, H.J., Choi, S.J., Shin, W-S., Moon, T.W. (2003). Emulsifying properties of bovine serum albumin-galactomannan conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1049-1056.
- Kontopidis, G., Holt, C., Sawyer, L. (2004). Invited review: beta-lactoglobulin: Binding properties, structure, and function. *Journal of Dairy Science*, 87, 785-796.
- Lapolla, A., Fedele, D., Martano, L., Arico, N. C., Garboglio, M., Traldi, P., Seraglia, R., Favretto, D. (2001). Advanced Glycation End Products: A Highly Complex Set of Biologically Relevant Compounds Detected by Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 36, 370–378.
- Lee, K.G., Shibamoto, T. (2002). Toxicology and antioxidant activities of non-enzymatic browning reaction products: review. *Food Reviews International*, 18, 151-175.

- Li, C. P., Enomoto, H., Ohki, S., Ohtomo, H., Aoki, T. (2005). Improvement of functional properties of whey protein isolate through glycation and phosphorylation by dry heating. *Journal of Dairy Science*, 88, 4137-4145.
- Marshall, K. (2004). Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Review*, 9, 136-156.
- Martins, S.I.F.S., Jongen, W.M.F., van Boekel, M.A.J.S. (2001). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 364-373.
- Matsuda, T., Kato, Y., Watanabe, K., Nakamura, R. (1985). Immunochemical properties of proteins glycosylated through Maillard reaction: β -lactoglobulin-lactose and ovalbumin-glucose systems. *Journal of Food Science*, 50, 618-621.
- Metcalf, D.D., Astwood, J.D., Townsend, R., Sampson, H.S., Taylor, S.L., Fuchs, R.L. (1996). Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, S165-S186.
- Miralles, B., Martinez-Rodriguez, A., Santiago, A., van de Lagemaat, J., Heras, A. (2007). The occurrence of a Maillard-type protein-polysaccharide reaction between β -lactoglobulin and chitosan. *Food Chemistry*, 100, 1071-1075.
- Moreno, F.J., Quintanilla-Lopez, J.E., Lebron-Aguilar, R., Olano, A., Sanz, M.L. (2008). Mass spectrometric characterization of glycated β -lactoglobulin peptides derived from galacto-oligosaccharides surviving the in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19, 927-937.
- Morgan, F., Leonil, J., Molle, D., Bouhallab, S. (1997). Nonenzymatic lactosylation of bovine β -lactoglobulin under mild heat treatment leads to structural heterogeneity of the glycoforms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236, 413-417.
- Morgan, F., Léonil, J., Mollé, D., Bouhallab, S. (1999a). Modification of bovine β -lactoglobulin by glycation in a powdered state or in an aqueous solution: Effect on association behaviour and protein conformation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 83-91.
- Morgan, F., Mollé, D., Henry, G., Vénien, A., Léonil, J., Peltre, G., Levieux, D., Maubois, J-L., Bouhallab, S. (1999b). Glycation of bovine β -lactoglobulin: effect on the protein structure. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 429-435.

- Morgan, F., Henry, G., Le Graët, Y., Mollé, D., Léonil, J., Bouhallab, S. (1999c). Resistance of β -lactoglobulin-bound lactose to the hydrolysis by β -galactosidase. *International Dairy Journal*, 9, 813-816.
- Nacka, F., Chobert, J.M., Burova, T., Léonil, J., Haertlé, T. (1998). Induction of new physicochemical and functional properties by the glycosylation of whey proteins. *Journal of Protein Chemistry*, 17, 495-503.
- Nagasawa, K., Ohgata, K., Takahashi, K., Hattori, M. (1996). Role of the polysaccharide content and net charge on the emulsifying properties of β -lactoglobulin-carboxymethyldextran conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2538-2543.
- Neirynck, N., van der Meeren P., Gorbe, S.B., Dierckx, S., Dewettinck, K. (2004). Improved emulsion stabilizing properties of whey isolate by conjugation with pectins. *Food Hydrocolloids*, 18, 949-957.
- Oliver, C.M., Melton, L.D., Stanley, R.A. (2006). Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: A review. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 337-350.
- Onwulata, C.I. (2008). Milk whey processes: current and future trends. In C.I. Onwulata, & P.J. Huth, *Whey processing, functionality and health benefits* (pp. 369-389). Blackwell Publishing, USA.
- Rich, L.M., Foegeding, E.A. (2000). Effects of sugars on whey protein isolate gelation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5046-5052.
- Sanz, M. L., Corzo-Martínez, M., Rastall, R. A., Olano, A., Moreno, F. J. (2007). Characterization and in vitro digestibility of bovine β -lactoglobulin glycosylated with galacto-oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7916-7925.
- Sato, R., Noguchi, T., Naito, H. (1986). Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 32, 67-76.
- Trofinova, D., Jongh, H. (2004). Modification of β -lactoglobulin by oligofructose: impact on protein adsorption at the air-water interface. *Langmuir*, 20, 5544-5552.
- Van Boekel, M.A.J.S. (2001). Kinetic aspects of the Maillard reaction: A critical review. *Nahrung*, 45, 150-159.
- Villamiel, M., del Castillo, M.D., Corzo, N. (2006). Browning reactions. In: *Food Biochemistry and Food Processing*. Ed. Y.H. Hui, Blackwell Publishing USA pp 71-100.

- Wal, J.M. (2001). Structure and function of milk allergens. *Allergy*, 56, Suppl. 67, 35-38.
- Walstra, P., Jenness, R. *Dairy chemistry and physics*. Wiley, New York (1984).
- Wooster, T.J., Augustin, M.A. (2006). β -Lactoglobulin-dextran Maillard conjugates: Their effect on interfacial thickness and emulsion stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 303, 564-572.
- Wooster, T.J., Augustin, M.A. (2007). Rheology of whey protein-dextran conjugate films at the air interface. *Food Hydrocolloids*, 21 1072-1080.
- Zhu, D., Damodaran, S., Lucey, J.A. (2008). Formation of whey protein isolate (WPI)-dextran conjugates in aqueous solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7113-7118.

Alergia a proteínas lácteas.

Elena Molina, Rosa Chicón, Josefina Belloque, Rosina López-Fandiño

Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC. C/ Juan de la Cierva, 3. 28006 Madrid

Tel.: + 34 91 5622900 Fax: + 34 91 56445853

e.mail: e.molina@ifi.csic.es

1 Resumen

La alergia alimentaria es una reacción inmunológica mediada por IgE, que se origina en ciertos individuos como respuesta a la ingesta de un determinado alimento que, en el resto de la población, es perfectamente saludable. Constituye un serio problema de salud pública, de gran importancia por el aumento de la prevalencia en los últimos años, con síntomas que afectan seriamente a la calidad de vida de los individuos alérgicos, y que pueden ser leves o graves (incluso mortales).

Aproximadamente, la mitad de los casos de alergias alimentarias durante la infancia se asocian a alérgenos de origen animal, siendo la leche de vaca el segundo alérgeno más frecuente, probablemente porque es el primer antígeno alimentario con el que el ser humano entra en contacto en cantidades importantes. La alergia a leche de vaca tiene gran repercusión por la importancia de este alimento en los primeros años de vida de los niños. Los principales alérgenos de la leche son las proteínas séricas (particularmente, β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina y, en menor grado, seroalbúmina bovina) y las caseínas. Mediante provocación con proteínas purificadas de leche de vaca, se ha observado que la β -lactoglobulina es la proteína que induce con mayor frecuencia respuestas clínicas.

Hasta el momento la evitación del alimento es el tratamiento preventivo más recomendado, aunque presenta dificultades, limitaciones y riesgos. Sin embargo, se está avanzando en otros campos como en la producción de alimentos hipoalergénicos o en el desarrollo de nuevas formas de inmunoterapia. Estas terapias son

particularmente exitosas si comienza desde una edad temprana o poco después de que la alergia se desarrolle por primera vez.

2. Alergias alimentarias

La alergia se ha descrito como la epidemia del siglo XXI, ya que afecta al 40% de la población de los países desarrollados (Hoffmann-Sommergruber and the SAFE consortium, 2005). Su prevalencia se ha duplicado en los últimos 20 años, debido a factores genéticos, ambientales y nutricionales. La introducción en la dieta de nuevos productos y cada vez, a más temprana edad, influye de forma notable en ello. La supresión temprana de la lactancia materna para pasar al biberón y la ingesta de cereales, alimentos de gran capacidad alergénica, es otro factor que explica el incremento de las alergias. El mayor nivel de higiene en las poblaciones de los países industrializados puede jugar un papel crucial en el reciente aumento experimentado. Lo que es claro es que en la actualidad, constituyen un problema importante de salud pública y, en general, el conocimiento existente sobre esta enfermedad es limitado debido a la complejidad del proceso, en el que interactúan gran variedad de órganos fisiológicos, tipos de células y señales.

Las alergias alimentarias son reacciones anormales, exageradas, del sistema inmune a ciertos componentes de los alimentos, normalmente proteínas. Otros polímeros, como los polisacáridos, también pueden provocar reacciones aunque por lo general, mucho más leves y con menor frecuencia. Son alergias frecuentes y se estima que afectan al 3-4% de la población adulta y hasta un 6-8% de la población infantil menor de 3 años (Sicherer y Sampson, 2006). La incidencia de las alergias alimentarias, como ocurre con otros tipos de trastornos alérgicos, está en aumento, aunque los datos recogidos en el pasado no son suficientes para poder establecer comparaciones (Kagan, 2003). Desde ámbitos tan distintos como la industria

alimentaria, la biotecnología, la medicina o los propios consumidores y pacientes se aborda esta problemática y se plantean iniciativas para avanzar en el conocimiento de las alergias alimentarias con el fin de disponer de tratamientos y medidas preventivas eficaces (Asero y col., 2007). Es importante diferenciar reacciones adversas provocadas por los alimentos, que pueden tener origen toxicológico (contaminación microbiana), fisiológico (dispepsia), etc., de las que dependen de una susceptibilidad individual. Estas últimas se denominan alergias, si la hipersensibilidad está mediada por un mecanismo inmunológico, reconociendo como extraños a determinados componentes presentes en distintos alimentos que se denominan alérgenos, inocuos para la mayoría de las personas, e intolerancias, si el mecanismo responsable no es inmunológico (López-Fandiño, 2006) (Figura 1).

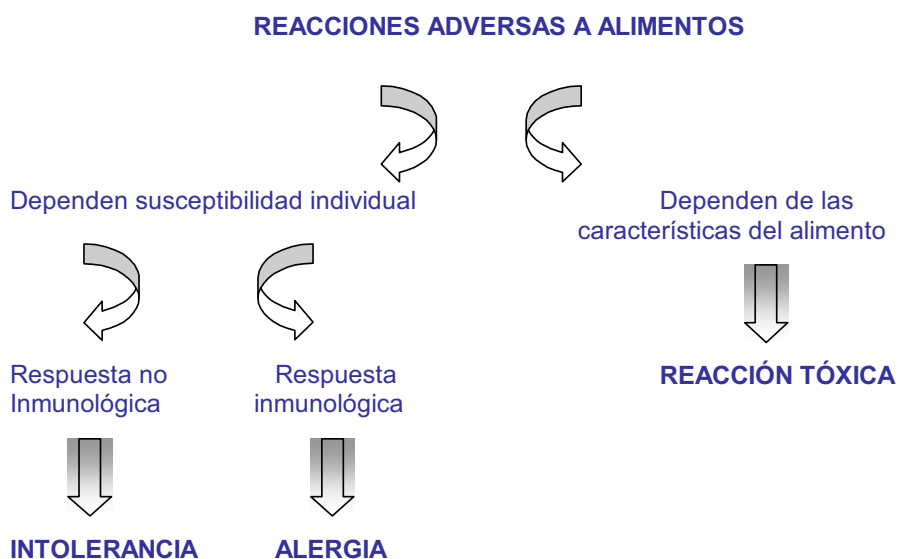


Figura 1. Clasificación de las reacciones adversas a los alimentos

La etiología de las alergias mediadas por inmunoglobulina E (IgE) conlleva una primera fase de sensibilización, que se produce en la primera ingestión del alimento que contiene el alérgeno, durante la cual se estimula el sistema inmune y la

producción de anticuerpos específicos (IgE, anticuerpos para neutralizar el alérgeno), y una segunda fase de reacción cruzada, donde se produce la interacción antígeno-anticuerpo que induce la activación de los mastocitos y la liberación del contenido de sus gránulos (desgranulación), incluyendo histamina y otras sustancias químicas en cantidades masivas para proteger al cuerpo y que inducen las respuestas clínicas específicas (síntomas alérgicos) y que ocurre en un contacto subsiguiente con el alérgeno. Estas respuestas se caracterizan por una variedad de síntomas, que pueden ser leves (como enrojecimiento, picores, etc.), o más severos (como diarreas, vómitos, etc.), pudiendo incluso producir la muerte (shock anafiláctico).

Las reacciones de hipersensibilidad, pueden dividirse en dos categorías: inmediatas y retardadas. En las primeras, los síntomas pueden aparecer a los pocos minutos (hasta una hora) de consumir el alimento y pueden ser bastante severos. En las reacciones de hipersensibilidad retardada, los síntomas no aparecen hasta después de 24 horas o más tras la ingestión del alimento. Estas reacciones, con excepción de la enfermedad celíaca, que implica una respuesta inmune anormal al trigo y otros cereales relacionados, son poco conocidas. Están implicadas respuestas anormales del sistema inmune celular, con la formación de células T sensibilizadas.

Las intolerancias alimentarias son reacciones anormales a los alimentos que no implican al sistema inmune. Un claro ejemplo es el de la intolerancia a la lactosa, que se produce como consecuencia de un desorden metabólico (López-Fandiño, 2006).

Cualquier alimento puede ser susceptible de producir una alergia alimentaria (Hefle y col., 1996), pero hay algunos alimentos que son más comúnmente alergénicos que otros, y son los llamados grandes 8 alérgenos (causantes de más del 90% de las alergias alimentarias documentadas mundialmente). Éstos son: leche, huevos, pescado, crustáceos, cacahuets, habas de soja, otros frutos secos (almendras, avellanas, anacardos, pistachos, nueces, piñones, etc.) y cereales que contienen gluten. La dosis umbral de los alimentos alergénicos puede ser extremadamente baja

(del orden de las partes por millón) y varía de unos individuos a otros. En algunos casos, como en algunos individuos alérgicos a los cacahuetes, la exposición a cantidades ínfimas, como las que se transmiten con un beso, puede producir un shock anafiláctico mortal¹.

El desarrollo de las alergias alimentarias depende de los hábitos alimenticios de los sujetos que las padecen, de forma que en Japón tiene gran incidencia el arroz, la harina y el tomate en Italia, el pescado en Escandinavia y el cacahuete en Estados Unidos (Kanny, 2007). También depende de la edad, por ejemplo, afecta a un 4-8% de la población durante la infancia y juventud y a un 1-2% de la población adulta (Jędrychowski y col., 2008). La alergia alimentaria infantil es, en la mayoría de los casos, el preludio de ulteriores enfermedades alérgicas respiratorias, como rinitis y asma por sensibilización a pólenes, ácaros, animales u hongos. En el caso de los niños, se dan principalmente durante los dos primeros años de vida. La leche, el huevo y el pescado son responsables del 90% de los casos en los menores de un año, y el huevo se revela como el alimento más alergénico en niños de uno a dos años. Los niños que presentan síntomas tempranos de alergia necesitarán más tiempo para tolerar ciertos alimentos, pero transcurridos unos años podrán (generalmente) volver a consumirlos, introduciéndolos de nuevo de manera paulatina y en pequeñas cantidades. La alergia a los alimentos es un trastorno que no conoce límites temporales ni estacionalidad (pueden darse en primavera, verano, otoño o invierno). El pronóstico de las alergias alimentarias en niños suele ser benigno. En general, los niños alérgicos a la leche o al huevo acaban tolerando estos productos cuando superan los dos o tres años de edad. Por otro lado, los adultos son más alérgicos a los frutos secos, mariscos, pescados y algunas frutas (Mills y Mackie, 2008).

¹ Caso ocurrido en 2005 en Québec, Canadá, cuando una adolescente murió por haber sido besada por su novio, que 9 h antes, había comido una tostada de mantequilla de cacahuete, lo que provocó un paro respiratorio en la joven y su muerte (Agencia Europa Press).

Los pacientes alérgicos con frecuencia experimentan reacciones cruzadas entre alimentos relacionados. Se habla de reacciones cruzadas entre alérgenos cuando éstos poseen una capacidad similar de unión a anticuerpos específicos, debido a su estructura molecular (Van Ree, 2004). Por ejemplo, los individuos sensibles a los crustáceos suelen ser alérgicos a todas las variedades de langosta, gamba o centollo, aunque puedan consumir moluscos. También pueden existir reacciones cruzadas entre las leches de vaca y cabra o entre los huevos de distintas especies, pero no hay patrones definitivos de reactividad. También se dan reacciones cruzadas entre alérgenos ambientales y alimentos, como polen con frutas y hortalizas (síndrome de alergia oral) y entre alergias al látex (muy comunes entre el personal sanitario) y los plátanos, kiwis, aguacates, etc.

De modo general, se asume que la alergenicidad de un alimento resulta de la integración de varios factores, tales como: propiedades alergénicas intrínsecas, cantidad ingerida, estabilidad en el medio gastrointestinal y estabilidad al procesado. Debido a la importancia de las reacciones alérgicas, existe un gran interés en definir las características fisicoquímicas de las proteínas alergénicas y explorar modos de disminuir los riesgos que ocasionan (Taylor y Lehrer, 1996).

La investigación de proteínas presentes de forma natural en animales o plantas, responsables de generar la mayor parte de las alergias alimentarias, centran la atención de investigadores, empresas alimentarias y administraciones públicas.

3. Alergia a la leche y productos lácteos

La leche de vaca es uno de los alimentos más comunes que causan alergia en los niños, y es la principal causa de reacciones alérgicas en los niños muy pequeños. Los bebés que son amamantados tienen menos riesgo de desarrollar una alergia a la leche que los que son alimentados con fórmulas infantiles. Gran parte de las alergias a

la leche mediadas por IgE aparecen en los niños en sus primeros 6 meses de vida, lo que supone un grave problema por la relevancia de este alimento en la dieta infantil. En algunos casos sus signos y síntomas pueden ser poco específicos y es difícil de diagnosticar, pero también pueden ser lo suficientemente graves como para causar la angustia no sólo para el niño alérgico, sino también para toda su familia (suelen incluir sibilancias, vómitos, urticaria y problemas digestivos y en sólo en muy pocas ocasiones causa reacciones anafilácticas que constituyan una grave amenaza para la vida) (Tabla 1). Estos síntomas varían de persona a persona y se producen en pocos minutos a unas pocas horas después de la ingestión de leche. En algunos casos, las reacciones se pueden desarrollar después de la exposición a la leche durante un periodo prolongado de tiempo. Además, la alergia a la leche de vaca puede ser el inicio de una vida con diferentes enfermedades atópicas para el individuo que la sufre. El desarrollo de la sensibilidad y la alergia a leche de vaca es un desorden complejo, aún no del todo entendido, aunque se cree que depende de la interacción entre la predisposición genética y factores de exposición a la leche de vaca (dosis, naturaleza del antígeno, dieta de la madre durante el embarazo, frecuencia de la administración, etc.) (Crittenden y Bennett, 2005).

Tabla 1. Síntomas clínicos de alergia a proteínas de leche de vaca.

SÍNTOMAS CUTÁNEOS	SÍNTOMAS DIGESTIVOS	SÍNTOMAS RESPIRATORIOS	SÍNTOMAS GENERALIZADOS
Angioedema Eritema Urticaria	Rechazo Vómitos Diarrea	Rinitis Conjuntivitis Tos Broncoespasmo	Edema de glotis Shock anafiláctico

La prevalencia de la alergia a leche de vaca en niños se sitúa entre el 2-3 % (Høst, 2002). En cuanto a la población adulta, dicha prevalencia se sitúa sobre el 1% (Kanny y col., 2001). No obstante, las alergias infantiles a leche tienden a evolucionar

hacia la tolerancia, aunque no siempre sucede así. Se ha estimado mediante pruebas de provocación controlada² que, a partir de los 4 años, solo el 10-15 % de los niños diagnosticados de alergia a leche siguen padeciéndola (Alonso y col., 2001). Los mecanismos sobre los que se establece la tolerancia son desconocidos, pero, a partir de las edades citadas, sólo en casos contados se producirá una evolución favorable y, además, la sintomatología provocada por la ingestión de pequeñas cantidades del alimento suele ser grave, incluso con afectación vital (anafilaxia) (Alvarado y col., 2000). Además, la asociación de la alergia a proteínas de leche de vaca con otras alergias alimentarias es alta. Cabe destacar la asociación con alergia a proteínas de huevo, que ocurre hasta en un 50 % de los casos (Alonso y col., 2001) o a proteínas de carne de vacuno, en 13 a 20% de los casos (Brill, 2008) y que puede llegar hasta el 92.9 % en algunos estudios (Martelli y col., 2002). La frecuencia de la sensibilización a otros alimentos como pescado, soja o frutos secos varía según los hábitos alimenticios de la población.

Un ejemplo muy común de reacciones cruzadas es el de las proteínas de leche de distintos mamíferos. Las personas alérgicas a leche de vaca, a menudo se sensibilizan contra leche de cabra y oveja por la alta similitud en la secuencia de las principales proteínas de las tres especies. Por ello, en la mayoría de los casos de alergia a proteína de leche de vaca, los anticuerpos IgE específicos también reaccionan frente a las proteínas de leche de cabra y oveja (Restani y col., 1999). Sin embargo, se han descrito ciertos casos de pacientes alérgicos a leche de cabra y oveja y que no lo son a leche de vaca. Estos casos afectan a niños mayores y se requiere una eliminación muy estricta de la leche de oveja y cabra y productos

² Las pruebas de provocación controlada consisten en la administración controlada y gradual de la sustancia sospechosa a través de diferentes vías: oral, conjuntival, nasal, bronquial, etc., para comprobar su tolerancia. Según el sistema de cegado empleado, puede llevarse a cabo de 3 formas: abierta, simple ciego y doble ciego.

derivados pues las reacciones suelen ser más severas que las que produce la leche de vaca (Ah-Leung, y col., 2006).

La alergia a leche de vaca en adultos es rara, pero severa. Las dosis de alérgeno que sensibilizan a este grupo son muy bajas y tanto las caseínas como las proteínas de suero están implicadas en el desarrollo de la alergia (Lam y col., 2008).

4. Características de las proteínas alergénicas.

De los millones de proteínas distintas que constituyen los alimentos, sólo algunas están clasificadas como alérgenos. Se asume que tienden a ser proteínas mayoritarias en el alimento, resistentes a la digestión y estables al procesado, sobre todo al tratamiento térmico. Algunos alimentos, como la leche, huevos y cacahuets contienen varias proteínas alergénicas, mientras que otros (nuez de brasil, gambas...) poseen un sólo alérgeno mayoritario. Debe destacarse que alimentos muy ricos en proteínas, como la ternera, pollo, cerdo, etc., raramente dan lugar a reacciones alérgicas, a pesar de contener una proteína muy similar a la que es el principal alérgeno de las gambas (con la que comparte un 60% de homología en cuanto a secuencia de aminoácidos).

La secuencia de aminoácidos y las principales características estructurales de los alérgenos alimentarios más comunes se conocen (Mills y Breiteneder, 2005). La mayoría son glicoproteínas solubles con tamaños moleculares entre 10 (tamaño mínimo necesario para inducir una respuesta inmunitaria) y 70 kDa (tamaño máximo que es absorbido por el sistema digestivo) y puntos isoeléctricos ácidos (Sicherer y Sampson, 2006), aunque no parece haber ningún patrón bioquímico característico de los alérgenos en general. Sólo algunas regiones de las proteínas son reconocidas por el sistema inmunitario, bien por las células B, que son las productoras de IgE, bien por las células T, también implicadas en el proceso. Tales regiones se denominan epítomos y pueden ser lineales, es decir secuencias ininterrumpidas de aminoácidos, o

conformacionales (reconocidos debido a la estructura tridimensional) (Figura 2). Dado que todos los alérgenos deben ser capaces de hacer de puente entre moléculas de IgE para causar desgranulación, han de contener al menos dos epítomos reactivos hacia dichos anticuerpos.

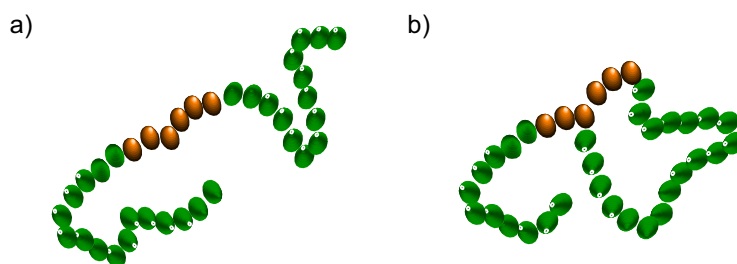


Figura 2. Epítomos lineales (a) y conformacionales (b).

El análisis *in silico* de los alérgenos (para relacionar secuencia, estructura y propiedades alergénicas de las proteínas) pone de manifiesto que la mayoría de los alérgenos alimentarios de origen animal, tienen homólogos en el proteoma humano, lo que puede condicionar la forma en que son reconocidos por el sistema inmunitario. Jenkins y col.. (2007) han clasificado la mayoría de los alérgenos alimentarios de origen animal en tres familias: tropomiosinas, proteínas con estructura EF y caseínas. Las tropomiosinas de los mamíferos son idénticas a sus homólogas humanas en al menos un 90%, mientras que las presentes en invertebrados sólo se parecen en un 55%, y así todas las alergias causadas por este tipo de proteínas proceden de insectos. Por su parte, las proteínas con estructura EF tan sólo causan alergia cuando proceden de ranas y peces, que son las que menos porcentaje de identidad presentan con las humanas. Finalmente, las caseínas, se encuentran solamente en la leche de los mamíferos y presentan un 53% de identidad en las secuencias de la mayoría de ellos en comparación con las humanas. Una vez clasificados los alérgenos de origen animal, estos autores han intentado identificar posibles relaciones de la secuencia de la proteína animal (estructura y propiedades alérgenas) con sus equivalentes

humanos. Los resultados sugieren que un 54% de proximidad entre unas y otras es el porcentaje que marca la barrera de sufrir o no alergia. En general, los autores apuntan que aunque teóricamente, todas las proteínas animales son susceptibles de llegar a ser alergénicas, en realidad, la probabilidad de que esta susceptibilidad desencadene una alergia depende de la distancia evolutiva de las proteínas animales con las humanas. Además, es una relación directamente proporcional: a más distancia evolutiva, mayor riesgo.

De esta forma se explica por qué las personas con alergia a la leche de vaca pueden tolerar, a menudo, la leche de yegua pero no la de cabra. Las proteínas de la leche de yegua tienen un 66% de homología con las proteínas de la leche humana, mientras que los alérgenos conocidos de vacas y cabras no llegan al 54%. La leche de yegua presenta menor distancia evolutiva con las proteínas humanas, lo que implica menor probabilidad de alergia. Cuando la distancia es mayor, el organismo, al estar en contacto con proteínas más 'desconocidas', podría reducir la capacidad del sistema inmunológico, por lo que generaría alergia con mayor facilidad (Jenkins y col., 2007).

La mayor parte de los alérgenos resisten la proteólisis, la digestión y otras formas de hidrólisis. La ruptura enzimática o ácida de las cadenas polipeptídicas puede destruir tanto los epítomos conformacionales como los lineales. En términos generales, se admite que el alérgeno debe mantener un determinado grado de estructura a través del tracto gastrointestinal, resistiendo a la degradación mediada por enzimas proteolíticas, pH bajo y surfactantes, tales como fosfolípidos y sales biliares, de modo que se produzcan fragmentos que contengan múltiples epítomos, capaces de producir una respuesta inmune. Por ello, la estabilidad a la digestión es considerada como una de las propiedades comunes a los alérgenos alimentarios, e incluso, dado que no hay métodos validados actualmente para predecir la alergenicidad, se usa como criterio para evaluar el potencial alergénico de los alimentos que contienen proteínas transgénicas. Sin embargo, la información disponible sobre las bases

estructurales de la estabilidad y resistencia de los alérgenos a la digestión es muy limitada, así como sobre las características de los fragmentos resultantes de la digestión que determinan su unión a IgE.

Muchas proteínas alergénicas son resistentes al calor. Éste, promueve la desnaturalización y la pérdida de los epítomos conformacionales de unión a IgE. Por ejemplo, en el caso de las seroproteínas lácteas, el tratamiento térmico reduce su antigenicidad, pero retienen alguna, incluso cuando se someten a un tratamiento térmico intenso. Además, la respuesta de diferentes pacientes alérgicos a la leche de vaca frente a proteínas calentadas varía, lo que ilustra la dificultad de usar el tratamiento térmico como un proceso hipoalergénico. Otros alérgenos alimentarios son sensibles a la desnaturalización por el calor (por ejemplo, los presentes en frutas frescas y vegetales), y otros alimentos, como los cacahuetes, contienen alérgenos termoestables y termolábiles. Debe destacarse que, en muchas ocasiones, se ha ignorado la influencia del procesado aunque varios estudios subrayan que puede inducir cambios estructurales que modulan la alergenicidad de las proteínas (Bredehorst y David, 2001). La base molecular de estos cambios radica en la inactivación o destrucción de las estructuras de los epítomos, pero también puede favorecerse el acceso a epítomos encriptados por desdoblamiento de la proteína, o la formación de epítomos nuevos a consecuencia de nuevos plegamientos tras la desnaturalización del alérgeno (Besler, 2001). A la hora de evaluar el efecto del procesado es muy importante tener en cuenta la presencia en el alimento, conjuntamente con las proteínas, de azúcares, lípidos, agentes oxidantes e incluso otras proteínas, cuyas interacciones durante el tratamiento o conservación posterior pueden tener incidencia en su alergenicidad (Moreno, 2007). La glicosilación mediante reacción de Maillard es, probablemente, la modificación covalente más importante que sufren las proteínas durante el calentamiento y/o almacenamiento de los alimentos. Como consecuencia de los efectos de la glicosilación en las propiedades de las

proteínas, es de esperar que su digestibilidad se vea alterada, con importantes consecuencias en sus propiedades nutritivas y biológicas, al condicionar la producción de distintos productos de degradación y su absorción intestinal (Maleki, 2004), aunque son necesarios estudios que comprueben su alergenidad.

5. Las proteínas lácteas como alérgenos

La alergia a la proteína de leche de vaca es una patología claramente asociada a la lactancia artificial, ya que sólo un 0.5% de los niños amamantados la sufre, y esto probablemente sea debido a la presencia de antígenos bovinos en la leche materna, como consecuencia de la dieta de la madre. La leche de vaca contiene más de 20 proteínas, todas ellas potencialmente alergénicas, si bien las descritas como más alergénicas son β -lactoglobulina (sin homóloga en la leche humana) y α -lactoalbúmina de las proteínas de suero y las caseínas (El-Agamy, 2007). La leche de vaca constituye generalmente el primer alérgeno que entra en contacto con el sistema inmune de los niños. Al comparar la leche de vaca y humana se deducen importantes diferencias cuantitativas y cualitativas. Por un lado, el contenido proteico en la leche de vaca es tres veces mayor que en la de mujer, y por otro lado, mientras que en la leche de vaca, el balance seroproteínas:caseínas es del 20:80, en la leche de mujer dicha proporción es del 60:40 (aunque puede diferir de unas madres a otras). Además, la β -lactoglobulina, proteína mayoritaria de las proteínas de suero bovino, no tiene homóloga en la leche humana.

La β -lactoglobulina se incluye dentro de la familia de las lipocalinas por su estructura de barril- β y su capacidad para unir ligandos (Kontopidis y col., 2004). A esta familia de proteínas se le atribuye un gran potencial alergénico. La β -Lg es muy estable y compacta a pH ácido, además ofrece una importante resistencia a las proteasas; de esta manera, tras la digestión gastrointestinal, parte de la molécula

puede permanecer intacta, aumentando así la probabilidad de absorción intestinal, tanto de los péptidos formados como de la proteína sin hidrolizar. En general, puede afirmarse que la β -Lg posee numerosos epítomos distribuidos a lo largo de toda la molécula. Estas regiones pueden estar localizadas en zonas hidrófobas de la proteína, inaccesibles para los anticuerpos IgE en la conformación nativa de la proteína, pero biodisponibles después de la digestión. La estructura tridimensional es una característica importante de la β -Lg pero, aparte de los epítomos conformacionales, diversos estudios han hecho posible establecer un mapa de la β -Lg con los epítomos lineales. Los epítomos de la β -Lg reconocidos por más del 90% de los individuos empleados en este estudio, correspondieron a los fragmentos (41-60), (102-124) y (149-162), en un segundo grupo se pueden incluir los fragmentos (1-8), (25-40) y (92-100) de inmunorreactividad intermedia, reconocidos por el 58-72% de los sueros. Por último las secuencias (9-14), (78-83), (84-91) y (125-135) fueron menos reactivas, reconocidas por el 40% de los sueros (Sélo y col., 1999). Järvinen y col., (2001) emplearon decapeptidos sintéticos con los que se cubrió la secuencia completa de la β -Lg. En sus ensayos, con sueros de pacientes alérgicos, identificaron 7 regiones reconocidas por IgE. Además, en este trabajo se proponen varios epítomos como marcadores en el pronóstico de alergia persistente a leche de vaca, aunque son resultados que precisan confirmación.

La secuencia de la α -lactoalbúmina (α -La) bovina presenta gran similitud con la α -La humana. Las secuencias reconocidas por IgE se sitúan en zonas de la molécula muy hidrofóbicas en las que la predicción de la antigenicidad es complicada y/o en secuencias de la molécula que guardan una gran homología con la α -La humana y es difícil su reconocimiento. Sharma y col., (2001) han descrito en la α -La un fragmento altamente inmunorreactivo (42-49), que constituye un bucle de unión entre dos cadenas antiparalelas, conformación que también se ha encontrado en la β -Lg y en la

lactoferrina, por lo que estos autores sugieren que ésta última también es una proteína alergénica. Otra proteína que se encuentra en bajas cantidades en el suero, como la seroalbúmina bovina, también puede producir reacciones alérgicas (Wal, 2001).

En cuanto a las caseínas, considerando su estructura tan poco compacta, y dado que son rápida y exhaustivamente degradadas por proteasas, a menudo se ha considerado que el poder inmunogénico de las caseínas era pobre, sin embargo, se encuentran entre las proteínas más alergénicas de la leche. La mayoría de los pacientes alérgicos a la fracción de caseínas presenta sensibilización a cada una de las 4 caseínas (Wal, 2004). Probablemente se produce una cosensibilización a las diferentes caseínas tras la disrupción de las micelas de caseínas durante el proceso digestivo. Por otro lado, también se atribuye a posibles mecanismos de reacción cruzada en los que estarían implicadas las regiones conservadas. En este sentido, se ha observado que la β -caseína bovina induce una elevada respuesta de IgE a pesar de ser una proteína abundante en la leche humana y de que las secuencias de β -caseína bovina y humana presenten una elevada homología (58%). En concreto, varias de las regiones más conservadas en la proteína bovina y en la humana contienen zonas con residuos de serina fosforilados responsables de reactividad cruzada (Bernard y col., 2000). En cuanto a las α_S -caseínas, cabe resaltar que algunos de los principales epítomos son continuos y se localizan en regiones hidrofóbicas de la molécula, sólo accesibles, cuando ésta ha sido desnaturalizada o degradada (Spuergin y col., 1996). También se ha observado que los epítomos reconocidos por IgE específicos frente a α_{S1} -caseína son distintos según se trate de pacientes con alergias a la leche de vaca persistente o transitoria (Chatchatee y col., 2001).

6. Diagnóstico

Alrededor de un 1-4% de los adultos europeos y entre un 6-8% de los niños menores de 3 años han sido diagnosticados con algún tipo de alergia alimentaria, aunque la percepción de los consumidores es que tales enfermedades son mucho más comunes y, según un reciente estudio de la Comisión Europea, alrededor de un 30% de la población cree sufrir algún tipo de alergia alimentaria. Tales autodiagnósticos son normalmente erróneos y tienden a implicar al alimento equivocado o a demasiados alimentos que, de este modo, son excluidos innecesariamente de la dieta. Sí se han incrementado los casos severos que cursan con asma y, de hecho, las alergias alimentarias se han convertido en la causa más común de reacciones anafilácticas graves en países industrializados. Lo que es indudable es que la preocupación por este tema ~~se~~ ha aumentado y cada vez más personas acuden a la consulta de los médicos especialistas en estos temas. Además de producir problemas respiratorios crónicos, la alergia interfiere con el crecimiento y desarrollo normal, puede causar discapacidad física y supone importantes cargas sociales y económicas, la última de las cuales se ha estimado en los EE.UU. que exceden los 4.5 millones de euros al año, sólo para la rinitis.

Debido a la variedad de síntomas implicados, la diagnosis de las alergias mediadas por IgE es a menudo difícil (Bischoff y Crowe, 2005). Primero debe existir una asociación entre el consumo de uno o más alimentos y el desencadenamiento de una reacción adversa, para lo que debe recurrirse a un alergólogo, que tras una exhaustiva historia clínica, se valdrá de dietas de eliminación y pruebas concretas de ingestión del alimento sospechoso, y no confiar en el autodiagnóstico. A continuación, debe probarse la existencia de un mecanismo mediado por IgE, para lo cual se recurre a pruebas cutáneas con extractos del alimento sospechoso, que se efectúan aplicando extractos diluidos del alimento en cuestión, o del alérgeno puro o semipuro, mediante una pequeña punción o arañazo. Tras 10-30 minutos se compara el halo (3 mm o

más) con el producido por un control negativo que contiene sólo el diluyente. Un resultado negativo excluye con fiabilidad la implicación de IgE, pero los resultados positivos tienen menos valor predictivo.

Para el diagnóstico de alergia a leche de vaca, una primera aproximación, además de anamnesis completa, son las pruebas cutáneas (habitualmente prick test) o la determinación de IgE específica sérica, siendo la técnica más común el test radioalergosorbente (RAST), imprescindible en pacientes con dermatitis atópica en los que no es posible efectuar pruebas cutáneas. En la rutina clínica, se emplea el sistema *ImmunoCAP* que usa extractos de alérgenos naturales o alérgenos recombinantes en un soporte sólido. Valores superiores a 2.5 kUI/L (kilo unidades internacionales de IgE específica por litro, kIU/L: 1IU= 2.4 ng de IgE, Standard WHO 75/502) de IgE específica tienen un valor predictivo positivo de un 90%. Debe destacarse que han sido importantísimos los progresos realizados durante los últimos años en cuanto a la secuenciación, clonación, y expresión de los alérgenos más comunes. Además, se están realizando muchos esfuerzos encaminados al desarrollo de métodos de screening económicos y rápidos que permitan la detección de IgE en sueros, empleando la mínima cantidad de suero y analizando simultáneamente cientos de alérgenos (*microarrays* de alérgenos).

En el caso de necesitar confirmación de la existencia de alergia a proteínas de leche de vaca, por ejemplo en pacientes que no manifiestan reacciones muy severas frente a ésta, se puede usar como prueba definitiva el test de provocación a doble-ciego (es ciego para el paciente y para el médico) controlada con placebo. Consiste en la administración controlada del alimento totalmente disfrazado (por ejemplo secado y encapsulado, o formando parte de otro alimento) a diferentes dosis, así como una variedad de placebos. En el lactante, la provocación abierta o a ciego simple, puede ser suficiente si es negativa o cuando ofrece un resultado positivo claro.

7. Tratamiento

Actualmente no existen tratamientos curativos para las alergias alimentarias, por ello la prevención de la aparición de alergias en el caso de niños con riesgo ha acaparado mucho interés. Sin embargo, los estudios clínicos sugieren que el desarrollo de alergias alimentarias puede retrasarse, pero no evitarse. Contribuyen a retrasar la aparición de alergias: la lactancia materna, el evitar alimentos alergénicos durante los primeros meses o años de vida y el uso de formulas infantiles hipoalergénicas.

Una vez tratada la reacción que provoca la alergia, la estricta eliminación del alérgeno que provoca la reacción es el tratamiento preventivo más recomendado. Es muy importante la identificación inequívoca de los alérgenos específicos pues la eliminación de ciertos alimentos, sin fundamento, de la dieta puede causar problemas nutricionales y retraso en el crecimiento (Eigenmann y col., 2008). En estos casos, la calidad de vida de los pacientes y sus familiares es mala, pues es necesario que el paciente esté entrenado para reconocer los distintos signos que indican su presencia, así como los ingredientes que puedan contenerlo, cuando elige alimentos envasados y que extreme las precauciones cuando consuma alimentos ya preparados porque tienen que fijarse mucho en lo que comen y esto altera mucho su día a día, su ámbito social, etc. (por ejemplo, niños que no pueden quedarse en los comedores escolares, salidas fuera de casa...).

Una alternativa a la evitación del alimento es el consumo de alimentos o ingredientes proteicos hipoalergénicos. El desarrollo de alimentos hipoalergénicos tiene como objetivo proporcionar productos tolerables por personas alérgicas. La modificación de las proteínas durante el procesado puede considerarse una estrategia sencilla y eficaz, sin embargo la mayoría de los alérgenos de las proteínas lácteas resisten el tratamiento térmico y la fermentación, de modo que no todos los procesos empleados en la industria alimentaria son adecuados para eliminar la alergenidad. La

hidrólisis enzimática es una estrategia comúnmente empleada para reducir la alergenicidad de la leche de vaca (Hays y Wood, 2005). De hecho, las empresas lácteas han realizado un gran esfuerzo para producir las fórmulas infantiles hipoalergénicas y que han diseñado a partir de leche o de proteínas de leche mediante hidrólisis enzimática. En principio, se asume que la hidrólisis de las proteínas de la leche reduce considerablemente su alergenicidad, sin embargo, hay estudios en los que se muestra que anticuerpos IgE específicos de pacientes alérgicos reconocen productos de digestión enzimática de proteínas de suero o caseínas, incluso con fórmulas extensamente hidrolizadas (Ragno y col., 1993). Estas reacciones adversas pueden atribuirse tanto a contaminaciones cruzadas con las proteínas nativas y otros antígenos en la línea de fabricación del alimento (Høst y Halken, 2004), como a la antigenidad residual que estas fórmulas puedan retener. Por ello se están proponiendo métodos alternativos como el uso de altas presiones hidrostáticas antes y durante la hidrólisis enzimática (Bonomi y col., 2003, Chicón y col., 2006). Por ejemplo la aplicación de 400 MPa durante la hidrólisis de β -Lg bovina fomenta la rápida producción de fragmentos de tamaños intermedios, que más tarde, son hidrolizados a fragmentos menores. Además la proteína intacta se elimina en pocos minutos con una considerable reducción en la antigenicidad del hidrolizado (Chicón y col., 2008). Esto conduce a la producción de hidrolizados con baja capacidad de unión a inmunoglobulina IgG e IgE y con potencial alergénico reducido, en comparación a los obtenidos por hidrólisis enzimática convencional (Peñas y col., 2006).

La desensibilización o inducción de tolerancia puede ser una alternativa para aquellos niños que no han alcanzado la tolerancia espontánea (Zapatero y col., 2008). En los últimos años, la inducción de la tolerancia administrada por vía oral o sublingual ha adquirido cada vez mayor atención. Varios estudios han demostrado que un número considerable de pacientes alérgicos puede tolerar gradualmente crecientes cantidades de alérgenos conocidos, incluidos la leche, huevo, maní, y avellana

(Patriarca y col. 1998). Los resultados de estos tratamientos van desde la protección contra la exposición accidental a la plena tolerancia de grandes porciones de alérgenos. Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han realizado con un número limitado de pacientes y pocos protocolos de dosificación. El principal inconveniente radica en el hecho de que no se conoce con certeza la duración del efecto y, por tanto, hasta qué punto y durante cuánto tiempo los pacientes pueden dejar de tomar el alimento sin riesgo.

8. Perspectivas futuras

Las nuevas tendencias en el diagnóstico de las alergias alimentarias se centran en dos áreas: la determinación de la correlación clínica entre las pruebas cutáneas y los niveles de IgE sérica específica, y de ambos con la probabilidad de desarrollar síntomas clínicos tras una exposición oral, y en la búsqueda de marcadores de tolerancia para predecir el desarrollo de tolerancia oral en niños. Sin embargo, en una revisión reciente sobre el valor predictivo de los niveles de IgE para el diagnóstico de la alergia a la leche de vaca, no parece haber acuerdo entre los estudios realizados hasta el momento (Sopo y col., 2007).

Para el tratamiento, se están intentando diseñar terapias inmunomoduladoras, que se basan en la hipótesis de que el tipo de respuesta inmune generada por un alérgeno depende del perfil de citoquinas que liberan las células T. La aplicación con éxito de las nuevas terapias inmunomodulatorias está condicionada a que se comprueben cuidadosamente sus efectos secundarios, como toxicidad, sobrestimulación de respuestas inmunes tipo Th1, autoinmunidad o efectos a largo plazo de la supresión de anticuerpos IgE circulantes. En cualquier caso, suponen una esperanza para los pacientes que no disponen de una terapia específica (Nowak-Wegrzyn, 2003). También, se están ensayando inmunoterapias con alérgenos recombinantes, que es posible que permitan configurar inmunoterapias a la medida de

las necesidades de cada paciente y otras terapias ensayan con anticuerpos monoclonales humanizados y adyuvantes bacterianos en combinación con las vacunas de proteínas modificadas o péptidos. En este sentido debe señalarse que los probióticos *B. lactis* Bb12 y *Lb. rhamnosus* GG ya se han empleado con éxito para disminuir el eczema atópico en lactantes (Isolauro y col., 2000).

Hay que resaltar que las alergias alimentarias cada vez preocupan más tanto a la industria alimentaria, como a biotecnólogos, médicos, consumidores y pacientes y es labor de todos proporcionar los medios para solucionarlas. El mejor conocimiento de los alérgenos alimentarios, y de los mecanismos implicados en las reacciones alérgicas, están contribuyendo de forma prometedora a nuevas formas de diagnóstico y terapéutica, con sus implicaciones sobre la prevención.

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación de los proyectos CYTED A.1.2, CM S-0505/AGR/0153, CONSOLIDER-INGENIO CDS-2007-00063 y AGL-2008-01740.

Referencias

- Ah-Leung, S., Bernard, H., Bidat, E., Paty, E., Rancé, F., Scheinmann, P., Wal, J.M. (2006). Allergy to goat and sheep milk without allergy to cow's milk. *Allergy*, 61, 1358-1365.
- Alonso, E., Fernández, L., Somoza, M. L. (2001). Alergia a leche y huevo en niños. *Alergología e Inmunología Clínica*, 6, 96-110.
- Alvarado, M. I., Alonso, E., G. Álvarez, M., Ibáñez, M. D., Laso, M. T. (2000). Persistencia de sensibilización a proteínas de leche de vaca, estudio clínico. *Allergologia et Immunopathologia*, 28, 189-192.
- Asero, R., Ballmer-Weber, B.K., Beber, K., Conti, A., Dubakienė, R., Fernández-Rivas, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Lidholm, J., Mustakov, T., Oude Elberink, J.N.G., Pumphrey, R.S.H., Van Ree, R., Vlieg-Boerstra, B.J., Hiller, R., Hourihane, J.O., Kowalski, M., Papadopoulos, N. G., Wat, J-M., Mills, E.N.C., Vieths, S. (2007). IgE-mediated food allergy diagnosis, current status and new perspectives. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(1), 135-147.
- Bernard, H., Meisel, H., Créminon, C., Wal, J.M. (2000). Post-translational phosphorylation affects the IgE binding capacity of caseins. *FEBS Letters* 467(2-3), 239-244.
- Besler, M. (2001). Determination of allergens in foods. *Trends in Analytical Chemistry*, 20, 662-672.
- Bischoff, S., Crowe, S. E. (2005). Gastrointestinal food allergy, new insights into pathophysiology and clinical perspectives. *Gastroenterology*, 128, 1089-1113.
- Bonomi, F., Fiocchi, A., Frokiaer, H., Gaiaschi, A., Iametti, S., Poesi, C., Rasmussen, P., Restani, P., Rovere, P. (2003). Reduction of immunoreactivity of bovine β -lactoglobulin upon combined physical and proteolytic treatment. *Journal of Dairy Research*, 70 (1), 51-59.
- Bredehorst, R., David, K. (2001). What establishes a protein as an allergen? *Journal of Chromatography B*, 756, 33-40.
- Brill, H. (2008). Approach to milk protein allergy in infants. *Canadian Family Physician*, 54, 1258-1264.
- Chatchatee, P., Järvinen, K-M., Bardina, L., Beyer, K., Sampson, H. A. (2001). Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on α s1-casein, Differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107, 379-383.

- Chicón, R., Belloque, J., Alonso, E., López-Fandiño, R. (2008). Hydrolysis under high hydrostatic pressure as a means to reduce the binding of beta-lactoglobulin to immunoglobulin E from human sera. *Journal of Food Protection*, 71 (7), 1453-1459.
- Chicón, R., Belloque, J., Recio, I., López-Fandiño, R. (2006). Influence of high hydrostatic pressure on the proteolysis of beta-lactoglobulin A by trypsin. *Journal of Dairy Research*, 73 (1), 121-128.
- Crittenden, R. G., Bennett, L. E. (2005). Cow's milk protein allergy. A multi-centre study, clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Nutrition*, 24 (6), 582S-591S.
- Díaz-Perales, A., Blanco, C., Sánchez-Monge, R., Varela, J., Carrillo, T., Salcedo, G. (2003). Analysis of avocado allergen (Prs a1) IgE-binding peptides generated by simulated gastric fluid digestion. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112, 1002-1007.
- Eigenmann, P.A., Beyer, K., Burks, A.W., Lack, G., Liacouras, C. A., Hourihane, J. O'B., Sampson, H. A., Sodergren, E. (2008). New visions for food allergy: An iPAC summary and future trends. *Pediatric Allergy and Immunology*, 19, 26-39.
- El-Agamy, E. I. (2007). The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Research*, 68, 64-72.
- Hays, T., Wood, R. A. (2005). A systematic review of the role of hydrolyzed infant formulas in allergy prevention. *Archives of Pediatrics and Adolescents Medicine*, 159: 810-816.
- Hefle, S. L., Nordlee, J. A., Taylor, S.L. (1996) Allergenic foods. *Critical Reviews Food Science-and Nutrition*, 36, S-69-S89.
- Hoffmann-Sommergruber, K. and the SAFE consortium. (2005). The SAFE project, 'plant food allergies, field to table strategies for reducing their incidence in Europe' an EC-funded study. *Allergy*, 60, 436-442.
- Høst, A. (2002). Frequency of cow's milk allergy in childhood. *Annals in Allergy and Asthma Immunology*, 89, 87-94.
- Høst, A., Halken, S. (2004). Hypoallergenic formulas-when, to whom and how long, after more than 15 years we know the right indication! *Allergy*, 59, 45-52.
- Isolauri, E., Arvola, T., Sutas, Y., Moilanen, E., Salminen, S. Probiotics (2000) in the management of atopic eczema. *Clinical Experimental Allergy*, 30, 1604-1610.
- Järvinen, K. M., Chatchatee, P., Bardina, L., Beyer, K., Sampson, H. A. (2001). IgE and IgG binding epitopes on α -lactalbumin and β -lactoglobulin in cow's milk milk allergy. *International Archives of Allergy and Immunology*, 126: 111-118.

- Jędrychowski, L., Wroblewska B., Szymkiewicz A. (2008). State of the art on food allergens - a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 58 (2), 165-175.
- Jenkins, J. A., Breitender, H., Mills, E. N. C. (2007). Evolutionary distance from human homologs reflects allergenicity of animal food proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120 (6), 1399-1405.
- Kagan, R.S. (2003). Food Allergy: An Overview. *Environmental Health Perspectives*, 111 (2), 223-225.
- Kanny, G. (2007). Allergie alimentaire. Les revues du Praticien, 57, 1331-1338.
- Kanny, G., Moneret-Vautrin, D-A., Flabbee, J., Beaudouin, E., Morisset, M., Thevenin, F. (2001). Population study of food allergy in France. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108 (1) 133-140.
- Kontopidis, G., Holt, C., Sawyer, L. (2004). β -Lactoglobulin, Binding Properties, Structure, and Function. *Journal of Dairy Science*, 87, 785-796.
- Lam, H-Y., van Hoffen, E., Michelsen, A., Guikers, K., van der Tas, C. H. W., Bruijnzeel-Koomen, C. A. F. M., Knulst, A. C. (2008). Cow's milk allergy in adults is rare but severe, both casein and whey proteins are involved. *Clinical and Experimental Allergy*, 38(6), 995-1002.
- López-Fandiño, R. (2006). Alergias e intolerancias alimentarias. En: *Alimentación y Nutrición. (Módulo II)*. Ed. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Acción Médica, S.A. Madrid, España. pp, 149-172.
- Maleki, S. J. (2004). Food processing, effects on allergenicity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 4, 241-245.
- Martelli, A., De Chiara, A., Corvo, M., Restani, P., Fiocchi, A. (2002). Beef allergy in children with cow's milk allergy; cow's milk allergy in children with beef allergy. *Annals of Allergy and Asthma Immunology*, 89 (6 Suppl 1), 38-43.
- Mills, E.N.C., Breiteneder, H. (2005). Food allergy and its relevance to industrial food proteins. *Biotechnological Advances*, 23: 409-414.
- Mills, E.N.C y Mackie, AR. (2008). The impact of processing on allergenicity of food. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 8(3), 249-253.
- Moreno, F.J. (2007). Gastrointestinal digestion of food allergens: Effect on their allergenicity. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 61(1), 50-60.
- Nowak-Węgrzyn, A. (2003). Future approaches to food allergy. *Pediatrics*, 111, 1672-1680.

- Patriarca G., Schiavino, D., Nucera, E., Schinco, G., Milani, A., Gasbarrini, G.B. (1998). Food allergy in children: results of a standardized protocol for oral desensitization. *Hepatogastroenterology*, 45, 52-58.
- Peñas, E., Restani, P., Ballabio, C., Préstamo, G., Fiocchi, A., Gómez, R. (2006). Evaluation of the residual antigenicity of dairy whey hydrolysates obtained by combination of enzymatic hydrolysis and high-pressure treatment. *Journal of Food Protection*, 69 (7), 1707-1712.
- Ragno, V., Giampietro, P.G., Bruno, G., Businco, L. (1993). Allergenicity of milk protein hydrolysate formulae in children with cow's milk allergy. *European Journal of Pediatrics*, 152, 760-762.
- Restani, P., Gaiaschi, A., Plebani, A., Beretta, B., Cavagni, G., Fiocchi, A., Poiesi, C., Velona, T., Ugazio, A. G., Galli, C. L. (1999). Cross-reactivity between milk proteins from different animal species. *Clinical and Experimental Allergy*, 29 (7), 997-1004.
- Sélo, I., Clement, G., Bernard, H., Chatel, J. M., Creminon, C., Peltre, G., Wal, J. M. (1999). Allergy to bovine β -lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. *Clinical and Experimental Allergy*, 29, 1055-1063.
- Sharma, S., Kumar, P., Betzel, Ch., Sing, T. P. (2001). Structure and function of proteins involved in milk allergies. *Journal of Chromatography B*, 756, 183-187.
- Sicherer S.H., Sampson, H.A. (2006). Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117, S470-S475.
- Spuerger, P., Mueller, H., Walter, M., Schiltz, E., Foster, J. (1996). Allergenic epitopes of bovine S1-casein recognized by human IgE and IgG. *Allergy*, 51, 306-312.
- Sopo, S.M., Radzik, D., Calvani, M. (2007). The predictive value of specific immunoglobulin E levels for the first diagnosis of cow's milk allergy. A critical analysis of pediatric literature. *Pediatric Allergy and Immunology*, 18, 575-582.
- Taylor, S. L., Lehrer, S. B. (1996). Principles and characteristics of food allergens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, S91-S118.
- Van Ree, R. (2004). Clinical importance of cross-reactivity in food allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 4, 235-240.
- Wal, J. M. (2001). Structure and function of milk allergens. *Allergy*, 56 (S67), 35-38.
- Wal, J. M. (2004). Bovine milk allergenicity. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 93, 2-11.
- Zapatero, L., Alonso, E., Fuentes, V., Martinez, M. I. (2008). Oral Desensitization in Children with Cow's Milk Allergy. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 18 (5), 389-396.

Estructura y funcionalidad del glicomacropéptido bovino

F. Javier Moreno y Rosina López-Fandiño

Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC). C/ Juan de la Cierva, 3 28006 Madrid

Tel. 915622900 Fax 915644853

E-mail: j.moreno@ifi.csic.es y rosina@ifi.csic.es

1. Características generales del caseinmacropéptido bovino.

El caseinmacropéptido (CMP) es el fragmento C-terminal liberado por la acción proteolítica de la renina sobre la κ -caseína durante las etapas iniciales de la fabricación del queso o por la acción de la pepsina durante el proceso de digestión gástrica. La κ -caseína se hidroliza por el enlace Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶, formándose dos polipéptidos muy diferentes: la para- κ -caseína (que comprende los residuos 1-105), ligeramente catiónica a pH 6.6, hidrofóbica y poco soluble y el CMP (residuos 106-169), fuertemente polar por lo que difunde hacia la fase acuosa, eliminándose durante el desuerado con el suero de quesería (Delfour y col., 1965). El CMP se halla en concentraciones relativamente elevadas (1.2-1.5 g/L) en los sueros de quesería, y supone aproximadamente el 15-20% (p/p) del contenido total de proteínas en el suero bovino (Marshall, 1991; Saito y col., 1991). El CMP es un péptido de carácter ácido debido a que posee un punto isoeléctrico en torno a 4-5, presenta una elevada solubilidad y termoestabilidad, y puede existir en múltiples isoformas debido a que puede poseer un gran número de modificaciones post-traduccionales (fosforilación y glicosilación), además de diferentes variantes genéticas, al igual que ocurre con la κ -caseína. En la tabla 1 se recoge a modo de resumen las variantes genéticas con las sustituciones de aminoácidos que las caracterizan, así como los lugares de glicosilación y fosforilación que contribuyen a la heterogeneidad del CMP bovino.

Tabla 1. Composición aminoacídica del CMP bovino, variantes genéticas y modificaciones post-traduccionales implicadas en su heterogeneidad. La nomenclatura está basada en la secuencia de aminoácidos de la κ -caseína bovina.

Estructura Primaria (variante A)	Polimorfismo genético	Lugares de glicosilación	Lugares de fosforilación
κ -CN f(106-169) Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn- Gln-Asp-Lys-Thr-Glu-Ile-Pro-Thr-Ile- Asn-Thr-Ile-Ala-Ser-Gly-Glu-Pro-Thr- Ser-Thr-Pro-Thr-Thr-Glu-Ala-Val- Glu-Ser-Thr-Val-Ala-Thr-Leu-Glu- Asp-Ser-Pro-Glu-Val-Ile-Glu-Ser- Pro-Pro-Glu-Ile-Asn-Thr-Val-Gln-Val- Thr-Ser-Thr-Ala-Val	A/F) T ¹³⁵ T ¹³⁶ D ¹⁴⁸ I ¹⁵³ S ¹⁵⁵ B/C=D) T ¹³⁵ I ¹³⁶ A ¹⁴⁸ I ¹⁵³ S ¹⁵⁵ B2) T ¹³⁵ I ¹³⁶ A ¹⁴⁸ T ¹⁵³ S ¹⁵⁵ E) T ¹³⁵ T ¹³⁶ D ¹⁴⁸ I ¹⁵³ G ¹⁵⁵ G/H) I ¹³⁵ T ¹³⁶ D ¹⁴⁸ I ¹⁵³ S ¹⁵⁵	T ¹²¹ T ¹³¹ T ¹³³ T ¹³⁵ T ¹³⁶ S ¹⁴¹ T ¹⁴² T ¹⁶⁵	S ¹²⁷ S ¹⁴⁹
Mercier y col. (1973)	Alexander y col. (1988) Coolbear y col. (1996) Prinzenberg y col. (1999)	Claverol y col. (2003) Holland y col. (2004) Minkiewicz y col. (1996) Mollé & Léonil (1995) Pisano y col. (1994) Vreeman y col. (1986)	Claverol y col. (2003) Holland y col. (2004) Mercier (1981) Minkiewicz y col. (1996) Mollé & Léonil (1995) Talbo y col. (2001)

En cuanto a las estructuras de los CMPs ovino y caprino, se puede encontrar información específica en el trabajo de revisión realizado por Manso & López-Fandiño (2004).

Como se observa en la tabla 1, se han descrito hasta 11 variantes genéticas para la κ -caseína, siendo las variantes A y B las más frecuentes en leche bovina. Estas variantes se diferencian por dos sustituciones aminoacídicas: Thr¹³⁶ y Asp¹⁴⁸ en la variante A, por Ile¹³⁶ y Ala¹⁴⁸ en la variante B. Respecto al grado de fosforilación, se han descrito tres lugares posibles de modificación. La Ser¹⁴⁹ siempre está fosforilada, por lo que todas las moléculas de CMP bovino contienen, al menos, un grupo fosfato (Vreeman y col., 1986; Mollé & Léonil, 1995; Rasmussen y col., 1997). Debido a que se han identificado formas de CMP bovino difosforilado, aunque en unos niveles mucho más bajos que la forma monofosforilada, se ha propuesto un posible segundo lugar de fosforilación en la Ser¹²⁷ que, a diferencia de la Ser¹⁴⁹, sólo se encuentra parcialmente fosforilada. Además, Mollé & Léonil (1995) identificaron CMP bovino trifosforilado, aunque no determinaron el tercer lugar de fosforilación. Las formas mono-, di- y tri-fosforiladas fueron cuantificadas y supusieron un 78%, 20% y 2%, respectivamente.

Las formas glicosiladas representan alrededor del 50% del CMP bovino, y son conocidas bajo el nombre genérico de glicomacropéptido (Vreeman y col., 1986). En la κ -caseína bovina se han caracterizado 5 estructuras glicosídicas de tipo-mucina formadas por residuos de ácido siálico, concretamente *N*-acetil neuramínico (NeuAc), galactosa (Gal) y *N*-acetil galactosamina (GalNAc) (Saito & Itoh, 1992), las cuales son descritas a continuación: i) monosacárido GalNAc-O-R, ii) disacárido Gal β 1-3GalNAc-O-R, iii) trisacárido NeuAc α 2-3 Gal β 1-3GalNAc-O-R, iv) trisacárido Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc-O-R, v) tetrasacárido NeuAc α 2-3Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc-O-R.

Estos carbohidratos se unen a la cadena peptídica a través de enlaces O-glicosídicos entre la GalNAc y los residuos de Ser o Thr. Todos los lugares potenciales de glicosilación de la κ -caseína se encuentran en la región perteneciente al CMP. Así, los residuos Thr¹³¹, Thr¹³³, Thr¹³⁶ (variante A), y Thr¹⁴² parecen ser los lugares de glicosilación más importantes, aunque también han sido propuestos como lugares potenciales de glicosilación los residuos Thr¹⁶⁵, Thr¹³⁵ y Ser¹⁴¹ (Kanamori y col., 1980; Pisano y col., 1994; Takeuchi y col., 1985; Zevaco & Ribadeau-Dumas, 1984). Más recientemente, se ha procedido a la identificación de los lugares de glicosilación por técnicas proteómicas lo que ha permitido revelar que los principales residuos glicosilados son Thr¹³¹, Thr¹⁴² y Thr¹³³ (Holland y col., 2004). La microheterogeneidad del CMP a nivel glicosídico no sólo engloba la diversidad de estructuras de oligosacáridos, sino también el número y la localización de estas estructuras a lo largo de la cadena polipeptídica. Así, Mollé & Léonil (1995), identificaron hasta 14 formas glicosiladas diferentes de CMP bovino de la variante genética A, además de las formas no glicosiladas.

El CMP es un péptido multifuncional con un gran número de posibles aplicaciones biológicas como han puesto de manifiesto una serie de trabajos de revisión publicados durante la última década (Abd El-Salam y col., 1996; Brody, 2000; Dziuba & Minkiewicz, 1996; Manso & López-Fandiño, 2004; Thomä-Worringer y col., 2006). Diversos estudios que han abordado la relación estructura-actividad del CMP han determinado la importancia de ciertos aspectos estructurales sobre la función biológica ejercida. Particularmente, las bioactividades basadas en las interacciones con componentes celulares están estrechamente relacionadas con el contenido y estructura de los oligosacáridos, mientras que otras actividades que pueden ser ejercidas por pequeños péptidos contenidos en la cadena aminoacídica dependen exclusivamente de la estructura primaria. La potencial utilidad del CMP como un

compuesto bioactivo multifuncional está avalada por diversos estudios que han detectado la presencia de los CMPs bovino y humano en concentraciones fisiológicamente activas en el plasma sanguíneo de recién nacidos y adultos (Chabance y col., 1995; Chabance y col., 1998). En este sentido, varios estudios *in vivo* han mostrado que el CMP es liberado intacto en el estómago y sólo sufre hidrólisis parciales tras la acción de las enzimas pancreáticas (Fosset y col., 2002; Ledoux y col., 1999), aunque el nivel de proteolisis puede variar en función del grado de glicosilación (Boutrou y col., 2008). Además, el CMP de origen ovino ha mostrado tener una vida media en plasma muy larga tanto en humanos como en cobayas (Qian y col., 1995). Por último, se han encontrado varios fragmentos activos de la κ -caseína en el torrente sanguíneo de humanos y ratas, evidenciando la resistencia y posterior absorción de secuencias activas de péptidos, generados tras su digestión *in vitro* e *in vivo* (Chabance y col., 1998; Fosset y col., 2002).

Por otra parte, al CMP también se le han atribuido una serie de propiedades funcionales de tipo tecnológico que contribuyen al interés de su uso como ingrediente en el diseño de nuevos alimentos con propiedades beneficiosas para la salud. Además de su elevada solubilidad y termoestabilidad, el CMP bovino posee una buena capacidad emulsionante, con un máximo de actividad observado a pH alcalino y un mínimo en el rango de pH entre 4.5 y 5.5 (Martín-Diana y col., 2005). Sin embargo, la estabilidad de la emulsión del CMP tratado térmicamente disminuyó tras 24 horas de almacenamiento (Chobert y col., 1989; Minkiewicz y col., 1996; Moreno y col., 2002). Resultados más recientes han mostrado que el CMP bovino no-glicosilado tiene mejores propiedades emulsionantes, incluyendo una mayor estabilidad de la emulsión, que el CMP glicosilado (Kreuz y col., 2009). Estos autores indicaron que las estructuras glicosídicas favorecen una combinación de efectos hidrofílicos, electrostáticos y estéricos impidiendo una adsorción ordenada de las moléculas del

CMP glicosilado en la interfase aceite/agua, mientras que el CMP no-glicosilado forma una red muy estable en la propia interfase. El CMP modificado covalentemente con disacáridos o ácidos grasos puede presentar una funcionalidad mejorada e, incluso, aumentar su actividad biológica (Moreno y col., 2002; Wong y col., 2006). El lector puede encontrar información adicional sobre las propiedades funcionales tecnológicas del CMP y su incorporación en la matriz del alimento en el artículo publicado por Thomä-Worringer y col. (2006).

Se han descrito distintos métodos para la purificación y aislamiento del CMP, basados, principalmente, en técnicas cromatográficas o de separación con membranas como la ultrafiltración, siendo esta última la más empleada por la industria debido a la mayor facilidad de escalado y bajo coste. La mayoría de los métodos de ultrafiltración hacen uso del efecto que tiene el pH sobre el peso molecular del CMP, que permite modificar su volumen hidrodinámico y separarlo de otras proteínas séricas (Kawasaki y col., 1993a). Los cambios inducidos por el pH en el peso molecular del CMP han sido atribuidos a asociaciones del mismo CMP a través de interacciones no-covalentes que conducen a la formación de oligómeros a pH neutro, los cuales se disocian parcialmente a pH ácido (Kawasaki y col., 1993a; Xu y col., 2000). Sin embargo, existe cierta controversia sobre este comportamiento como puede deducirse de otros trabajos publicados (Mikkelsen y col., 2005a; Minkiewicz y col., 1996). Otros métodos de aislamiento utilizan la alta estabilidad térmica que presenta el CMP en comparación con otras proteínas del suero, las cuáles experimentan un proceso de desnaturalización y posterior agregación a 90°C, facilitando su posterior separación por ultrafiltración (Martín-Diana y col., 2002; Metwally y col., 2001). Una alternativa a la separación del CMP de las proteínas del suero es el tratamiento de la caseína micelar con quimosina para obtener una solución enriquecida en CMP, como paso previo a la concentración por microfiltración o diafiltración (Thomä & Kulozik, 2004).

Respecto a su producción recombinante, se ha obtenido CMP humano no-glicosilado expresado en *Escherichia coli* con un elevado rendimiento (Liu y col., 2008). Además, se ha obtenido CMP humano glicosilado recombinante empleando levaduras, aunque el grado de glicosilación resultante fue sensiblemente inferior al del CMP bovino original (Kim y col., 2005). También, se ha experimentado con conejos transgénicos para producir leche con niveles elevados de κ -caseína con bajo contenido en Phe. En este caso, hasta cuatro de los cinco residuos de Phe pudieron ser mutados en la proteína recombinante, manteniendo su capacidad para formar micelas y su digestibilidad hacia la quimosina (Baranyi y col., 2007).

Considerando los diferentes procesos disponibles para la producción del CMP, y la importancia de su estructura, y en particular la glicosilación, en sus actividades biológicas, es necesario determinar si la metodología empleada para la obtención del CMP influye en su estructura y actividad (Li & Mine, 2004a; Lieske y col., 2004; Thomä-Worringer y col., 2006). Finalmente, es necesario indicar que los procesos tecnológicos, tales como el tratamiento térmico, y el posterior almacenamiento del CMP podrían afectar a su grado de glicosilación y/o estabilidad química (Lieske y col., 2004).

2. Bioactividad del caseinmacropéptido glicosilado.

El contenido en ácido siálico del CMP es muy determinante en cuanto al tipo de actividad biológica que pueda desarrollar. Los ácidos siálicos son unos derivados de los monosacáridos, formados como consecuencia de la condensación aldólica entre el ácido pirúvico y una *N*-acetil hexosamina (Figura 1). Se han encontrado elevadas cantidades de este carbohidrato formando parte de gangliósidos y glicoproteínas en el cerebro y en el sistema nervioso central, contribuyendo al correcto funcionamiento de los receptores de membrana, de las membranas celulares y al desarrollo normal del

cerebro. De este modo, un experimento *in vivo* con lechones mostró que la administración exógena de ácido siálico produjo un aumento en la producción de gangliósidos con ácido siálico en el cerebro, mejorando la capacidad de aprendizaje. (Wang y col., 2001; Wang y col., 2004). De hecho, este efecto pudo ser también observado tras la inclusión de CMP en la dieta de los animales como fuente de ácido siálico, y se relacionó con una mayor concentración de sialoglicoproteínas presentes en la corteza cerebral frontal y con unos niveles mayores de RNA mensajero de dos genes implicados en la capacidad de aprendizaje (Wang y col., 2007).

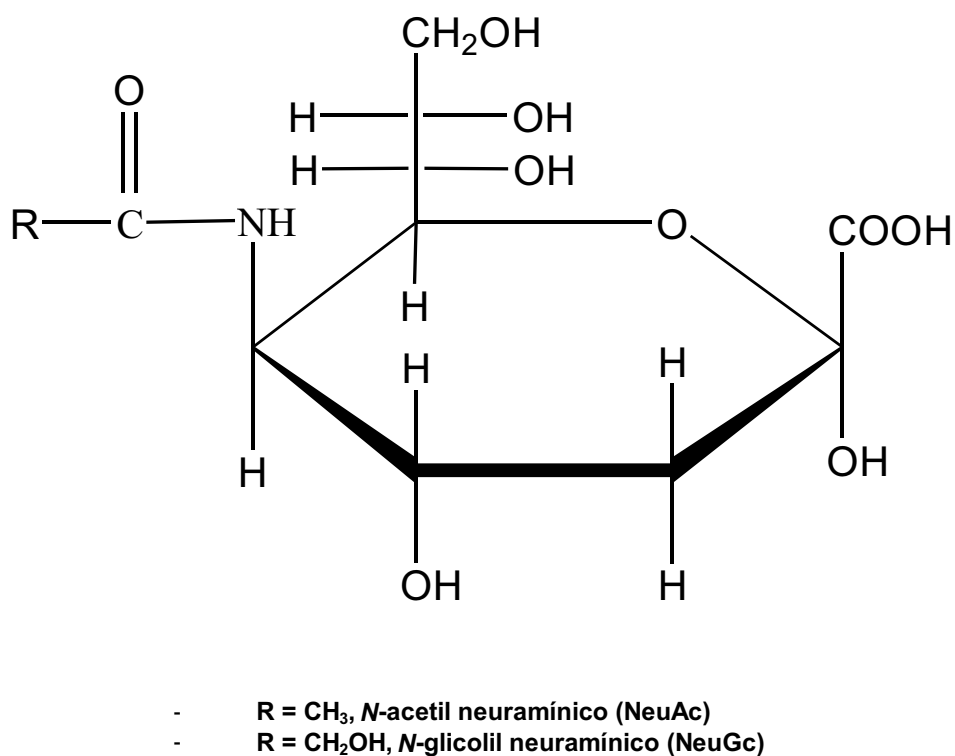


Figura 1. Estructura de los ácidos siálicos presentes en el CMP bovino (NeuAc), ovino (NeuGc) y caprino (NeuAc + NeuGc).

La κ -caseína y el CMP interaccionan con toxinas, virus y bacterias, ejerciendo una serie de actividades beneficiosas para la salud mediadas fundamentalmente por la

fracción glicosídica. Esto es debido a que un gran número de patógenos y enterotoxinas pueden adherirse a ciertas células tras ser reconocidos por receptores compuestos por oligosacáridos (Dziuba & Minkiewicz, 1996). De este modo, la κ -caseína humana inhibió la adhesión de *Helicobacter pylori* a diferentes secciones de la mucosa estomacal (Strömquist y col., 1995). Igualmente, el CMP es considerado como un ingrediente con capacidad para prevenir los desórdenes gastrointestinales causados por patógenos tales como el *Vibrio cholerae*, ya que interacciona con la toxina del cólera, inhibiendo la unión de ésta a los gangliósidos. Esta actividad desapareció cuando fue eliminado el ácido siálico del CMP (Kawasaki y col., 1992; Oh y col., 2000). La presencia de ácidos siálicos sobre la superficie de las células diana es necesaria para que se produzca la infección del virus influenza. Por ello, sustancias que contengan ácidos siálicos pueden proteger a las células de la infección. Así, se ha comprobado que los CMPs bovinos con ácido siálico impiden la hemoaglutinación del virus influenza (Kawasaki y col., 1993b). De una forma similar, los residuos de ácido siálico son los responsables de que el CMP interaccione con patógenos tales como la *Salmonella enteritidis* y con el enterohemorrágico *Escherichia coli* 0157:H7 (Nakajima y col., 2005). Sin embargo, la actividad anti-adherente del CMP muestra una fuerte dependencia con el tipo de cepa del patógeno, lo que indica que los resultados obtenidos en este tipo de ensayos pueden estar condicionados por múltiples factores entre los que se incluyen el grado de glicosilación del CMP empleado en los experimentos, así como el uso de diferentes metodologías de ensayo y/o líneas celulares (Brück y col., 2002; Brück y col., 2003a; Brück y col., 2006a; Rhoades y col., 2005). Además, existe actualmente una falta de conocimiento a nivel molecular de ciertos receptores celulares de diferentes cepas de bacterias patógenas y no-patógenas que puede dificultar la interpretación de los resultados. Por último, una serie de estudios *in vivo* han demostrado que el CMP es capaz de paliar diarreas

provocadas por *Escherichia coli* en monos Rhesus, a la vez que facilita un aumento en la absorción de zinc (Brück y col., 2003b; Kelleher y col., 2003).

Por otra parte, el CMP glicosilado humano y bovino puede fomentar el crecimiento de bacterias del género *Bifidobacterium*, tales como *B. breve*, *B. bifidum*, y *B. infantis* (Azuma y col., 1984; Idota y col., 1994; Metwally y col., 2001). La administración de leche con un 2% de CMP produjo un aumento *in vitro* de *B. lactis* en comparación con leches no enriquecidas en CMP (Janer y col., 2004). La capacidad del CMP de promover una microflora intestinal saludable señala su potencial como ingrediente prebiótico en alimentos funcionales, o como suplemento en fórmulas infantiles para simular los efectos bacteriológicos beneficiosos de la leche materna; efectos que pueden ser potenciados dada su capacidad anti-adherente frente a ciertos patógenos descrita anteriormente (Brück y col., 2002; Brück y col., 2003a; Brück y col., 2006a). No obstante, cuando el efecto prebiótico de fórmulas infantiles suplementadas con CMP fue evaluado en niños sanos, no se pudo demostrar que el CMP ayudara a modular la composición de la flora gastrointestinal para hacerla más similar a la de los niños alimentados con leche materna. Una posible explicación para estos resultados dispares obtenidos entre los estudios *in vitro* e *in vivo*, es que el efecto prebiótico podría ser únicamente observado en aquellos individuos que presentaran poblaciones inicialmente bajas de microbiota beneficiosa (Brück y col., 2006b). Además, un requisito necesario para que el CMP pueda ejercer efectos deseables sobre la microflora intestinal, sería que la actividad anti-adherente fuera selectiva para patógenos y para organismos potencialmente perjudiciales para la flora probiótica beneficiosa (Rhoades y col., 2005).

La ingesta de CMP como fuente de ácido siálico resultó en un incremento del contenido de este carbohidrato en la saliva de lechones, afectando a su viscosidad y capacidad de protección frente a microorganismos (Wang y col., 2004). Así, se ha confirmado que el CMP inhibe la adhesión de bacterias cariogénicas como

Streptococcus sanguis, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* a la cavidad oral (Neesser y col., 1988, Neesser y col., 1994; Vacca Smith y col., 2000) y de modular la composición de la microbiota de la placa dental (Guggenheim y col., 1999; Schupbach y col., 1996). Estos datos sugieren que el CMP, formando parte de productos de higiene personal, podría ayudar a prevenir la formación de la caries dental al controlar la formación de ácido en la placa dental, reduciendo la disolución de hidroxiapatita del esmalte dental y ayudando a su remineralización (Aimutis, 2004).

Las glicoformas de CMP que contienen ácido siálico podrían también regular la ingesta de alimentos, así como ciertas funciones gastrointestinales a través de la estimulación de la colecistoquinina (CCK) liberada a partir de los receptores intestinales en el duodeno de animales y humanos (Beucher y col., 1994; Yvon y col., 1994). La CCK controla la ingesta de alimentos y su digestión mediante la regulación de la liberación de enzimas del páncreas y ralentizando las contracciones intestinales (Pedersen y col., 2000). Sin embargo, en contraste con la información publicada acerca de que el CMP puede disminuir el apetito, Ney y col. (2008) indicaron que el CMP no fue capaz de reducir la cantidad ingerida de alimentos en ratones en proceso de crecimiento. Así, diversas ratas Wistar alimentadas con un aislado de proteínas de suero (WPI) experimentaron una reducción significativa en su peso al compararse con ratas alimentadas con caseínas; sin embargo, la inclusión de CMP en la dieta de estos animales no produjo ningún efecto beneficioso sobre el control del peso en comparación con las alimentadas sólo con WPI, aunque sí pudo observarse una disminución en la acumulación de grasa abdominal (Royle y col., 2008). En humanos, un estudio realizado con adultos en un corto período de tiempo indicó que la administración oral de CMP (dosis comprendidas entre 0.4 y 2.0 gramos) no tuvo ningún efecto sobre el nivel de ingesta de alimentos o sobre indicadores subjetivos de saciedad (Gustafson y col., 2001). Por último, tampoco se encontraron efectos relevantes tras la ingesta diaria de CMP (dosis de 0.8 gramos) sobre la liberación de

CCK en 10 hombres y 10 mujeres, aunque se determinó que el CMP podría jugar un papel importante en la regulación de la ingesta de energía (Burton-Freeman, 2008). En otro artículo reciente, la ingesta de WPI enriquecido con CMP (con dosis diarias de 27 gramos de CMP durante 6 meses) no provocó ningún efecto adicional sobre la pérdida de peso producida por una alimentación con un alto contenido en proteínas (Keogh & Clifton, 2008). En estos dos últimos estudios, se concluyó que la ausencia de actividad del CMP sobre el control del peso corporal fue debida a que las dosis suministradas de CMP fueron sensiblemente inferiores a las empleadas en los estudios con ratas (Keogh & Clifton, 2008). Por lo tanto, en los casos en que se utilicen preparados alimenticios con bajo contenido en proteínas, puede ser necesario emplear dosis más elevadas de CMP para provocar el nivel de liberación de CCK y los efectos de saciedad descritos en los estudios realizados con animales (Burton-Freeman, 2008).

La κ -caseína también puede producir efectos inmunosupresores cuya actividad de inhibición depende de la fracción del CMP (Otani y col. 1992; Otani & Monnai 1993; Otani & Hata 1995). Se ha descrito que el CMP inhibe la concentración de mitógenos que participan en la inducción de la proliferación de linfocitos e, incluso, puede provocar procesos de apoptosis de ciertos linfocitos (Matin & Otani, 2000; Otani y col., 1995). Los efectos inmunomoduladores del CMP, tales como la inhibición de mitógenos que inducen respuestas de proliferación (Otani y col., 1995) y el aumento de la proliferación y actividad fagocítica de macrófagos humanos (Li & Mine, 2004b), dependen de la cadena polipéptidica y de la presencia de ácido siálico. Sin embargo, en contraposición a estos resultados, Mikkelsen y col. (2005b) afirmaron que el ácido siálico es irrelevante para la actividad inmunomoduladora de las cuatro proteínas lácteas sialiladas: κ -caseína, CMP, lactoferrina y el componente 3 de la fracción de proteosa-peptona. Esta discrepancia puede ser atribuida a que estos efectos dependen de la capacidad de respuesta inmunológica de las diferentes líneas de

ratones usadas para los ensayos de proliferación celular, y del tipo de célula y mitógeno empleado para estimular dicha proliferación (Gauthier y col., 2006; Mikkelsen y col., 2005b; Otani y col., 2005).

Monnai y col. (1998) mostró que el CMP posee una considerable actividad supresora frente a la producción de anticuerpos IgG específicos de la ovoalbúmina, contribuyendo a la regulación de la respuesta inmune a antígenos en mamíferos recién nacidos. La inmunización o la alimentación de ratones con κ -caseína dio lugar a los anticuerpos específicos para el CMP IgG1, IgG2 y IgM, mientras que el CMP *per se* careció de inmunogenicidad independientemente de la ruta de exposición (Mikkelsen y col., 2006). Si bien estos resultados sugieren que el CMP no causa, probablemente, ningún tipo de alergia, Pizzano y col. (2005) describió que, al menos el suero de un paciente que padecía alergia a la leche de vaca, contenía anticuerpos IgE que reconocieron exclusivamente las glicoformas de la κ -caseína bovina.

La κ -caseína y el CMP pueden influir en los procesos en cadena de la respuesta inflamatoria a través de la modulación de la producción de citoquinas, reduciendo la expresión de los receptores de interleuquina, o por inducción de los receptores antagonistas (Monnai & Otani, 1997; Otani & Monnai, 1995; Otani y col., 1996). Experimentos *in vitro* han mostrado que la κ -caseína inhibió todas las citoquinas proinflamatorias en las células dendríticas murinas estimuladas con lipopolisacáridos, mientras que el efecto provocado por el CMP y lactoferrina fue mucho menor, siendo estas actividades independientes del contenido en ácido siálico (Mikkelsen y col., 2005b). De hecho, el CMP exhibió una actividad anti-inflamatoria en ratas con colitis inducida por hapteno y, consecuentemente, el empleo de CMP fue propuesto en alimentos inmunosupresores, así como para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino (Daddaoua y col., 2005). Se ha descrito que

el mecanismo de acción puede implicar la regulación de la interleuquina 17 (Th17) y células reguladoras T (Requena y col., 2008).

3. Bioactividad y propiedades nutricionales del CMP no derivadas de su glicosilación.

El CMP tiene un perfil de aminoácidos bastante específico al no contener aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp), ni residuos de Cys, Arg o His, y poseer un relativamente alto porcentaje de aminoácidos de cadena ramificada (Ile y Thr) y bajo en Met. Estas características posibilitan que el CMP pueda ser un ingrediente adecuado para ser incluido en una amplia variedad de alimentos y bebidas con bajo contenido en Phe. Por ello, se ha recomendado la ingesta de CMP para individuos que padezcan fenilketonuria (PKU), que es un desorden de origen genético provocado por la deficiencia en la enzima hepática Fenilalanina Hidroxilasa, que implica una serie de consecuencias neuropsicológicas. No obstante, debido a que el CMP contiene cantidades limitadas de aminoácidos indispensables: Arg, His, Leu, Met, Trp and Tyr, se ha recomendado su inclusión en la dieta de personas con PKU únicamente como suplemento. Sin embargo, Ney y col. (2008) observaron unos crecimientos similares en ratones con PKU alimentados con una dieta basada en CMP y aquellos alimentados con una dieta tipo con un aporte completo de aminoácidos. Además, los ratones alimentados con CMP presentaron concentraciones significativamente más bajas de Phe en el plasma y cerebro. Finalmente, y como consecuencia de su alto contenido en Thr, una ingesta continuada de CMP podría causar hipertreoninemia (Fanaro & Vigi, 2002; Rigo y col., 2001). Además, se ha indicado que la administración de fórmulas infantiles con un bajo contenido en concentrados de proteínas de suero o libres de CMP producen niveles de aminoácidos en plasma más parecidos a los que presentan niños alimentados con leche materna; esto es, niveles más bajos de Thr y más altos de Trp y Cys (Mallee & Steijns, 2007; Sandström y col., 2008).

Ciertas actividades biológicas pueden ser producidas tanto por la κ -caseína y el CMP sin glicosilar, como por péptidos de pequeño tamaño que pueden ser liberados tras determinadas hidrólisis enzimáticas *in vitro* o *in vivo*. Así, varias secuencias con un número limitado de aminoácidos generadas por digestión enzimática poseen propiedades antimicrobianas frente a diversas bacterias Gram positivas y Gram negativas (López-Expósito y col., 2006; Malkoski y col., 2001).

La región 106-116 de la κ -caseína, que corresponde a la parte *N*-terminal del CMP, es análoga al fragmento 400-411 del fibrinógeno γ , lo que indica que el CMP puede inhibir la unión del fibrinógeno a sus receptores plaquetarios, impidiendo la agregación plaquetaria y la formación de trombos (Jollès y col., 1978; Jollès y col., 1986; Rutherford & Gill, 2000). Una serie de péptidos derivados de la secuencia 106-116 de la κ -caseína que pueden ser producidos tras hidrólisis con tripsina han mostrado su capacidad para inhibir la agregación plaquetaria *in vitro* (Léonil & Mollé, 1990; Manso y col., 2002; Maubois y col., 1991; Qian y col., 1995). Además, la actividad antitrombótica de los CMPs humano, bovino y ovino, así como los fragmentos 106-116 y 112-116 de la κ -caseína bovina ha sido demostrada con ensayos *in vivo* utilizando dosis efectivas más bajas que las obtenidas con los estudios *in vitro* de agregación plaquetaria. Así, por ejemplo, dosis de 1 mg kg⁻¹ de CMP presentaron actividad antitrombótica en cobayas (Bal dit Sollier y col., 1996).

También se han encontrado péptidos derivados de la hidrólisis con tripsina de los CMPs bovino, ovino y caprino con actividad inhibitoria *in vitro* de la enzima convertidora de Angiotensina I (ACE) (Manso & López-Fandiño, 2003). Además, el CMP y su hidrolizado triptico presentaron una acción *in vitro* relajante sobre los anillos aórticos con endotelio intacto, mientras que estudios *in vivo* revelaron que el CMP y su correspondiente hidrolizado con tripsina produjeron una disminución de la presión sanguínea en ratas espontáneamente hipertensas (Miguel y col., 2007). Teniendo en

cuenta que su eficacia debe ser previamente demostrada en humanos, el CMP y los péptidos derivados de su hidrólisis con tripsina podrían ser utilizados en el desarrollo de alimentos funcionales con capacidad para regular la circulación sanguínea, considerando sus efectos potencialmente beneficiosos sobre la salud cardiovascular.

4. Conclusiones

En los últimos años, el CMP bovino ha sido objeto de atención de numerosos estudios que le han atribuido diversas actividades biológicas en función de su secuencia específica de aminoácidos y de sus estructuras glicosídicas, siendo el ácido siálico el carbohidrato más determinante en cuanto a su funcionalidad. Además, ha demostrado poseer una serie de buenas propiedades tecnológicas y nutricionales dotándole de un valor adicional. Todas estas cualidades asignadas al CMP bovino y a sus péptidos derivados han contribuido a que sea un ingrediente que ha suscitado un indudable interés en la industria alimentaria para su formulación en alimentos funcionales y/o en alimentos de alto valor añadido dirigidos a grupos de consumidores que requieran dietas especiales.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por diferentes proyectos de investigación: CYTED N° XI.24; ALIBIRD S-0505/AGR/000153 de la Comunidad de Madrid; CONSOLIDER Ingenio 2010 (FUN-C-FOOD) CSD 2007-00063 del Ministerio de Educación y Ciencia; y PIF-SIALOBIOTIC 200870F0101 del CSIC.

Referencias

- Abd El-Salam, M. H., El-Shibiny, S., Buchheim, W. (1996). Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. *International Dairy Journal*, 6, 327-341.
- Aimutis, W. R. (2004). Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticarcinogenesis. *The Journal of Nutrition*, 134, 989S-995S.
- Alexander, L. J., Stewart, A. F., Mackinlay, A. G., Kapelinskaya, T. V., Tkach, T. M., Gorodetsky, S. I. (1988). Isolation and characterization of the bovine κ -casein gene. *European Journal of Biochemistry*, 178, 395-401.
- Azuma, N., Yamauchi, K., Mitsuoka, T. (1984). Bifidus growth-promoting activity of a glycomacropeptide derived from human κ -casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48, 2159-2161.
- Bal dit Sollier, C., Drouet, L., Pignaud, G., Chevalier, C., Caen, J. P., Fiat, A. M., Izquierdo, C., Jollès, P. (1996). Effect of κ -casein derived peptides on platelet aggregation and on thrombus formation in the guinea pig. *Thrombosis Research*, 81, 427-437.
- Baranyi, M., Hiripi, L., Szabó, L., Catunda, A. P., Harsányi, I., Komáromy, P., Bösze, Z. (2007). Isolation and some effects of functional, low-phenylalanine κ -casein expressed in the milk of transgenic rabbits. *Journal of Biotechnology*, 128, 383-392.
- Beucher, S., Levenez, F., Yvon, M., Corring, T. (1994). Effects of gastric digestive products from casein on CCK release by intestinal-cells in rat. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 5, 578-584.
- Boutrou, R., Jardin, J., Blais, A., Tomé, D., Léonil, J. (2008). Glycosylations of κ -casein-derived caseinomacropeptide reduce its accessibility to endo- but not exointestinal brush border membrane peptidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8166-8173.
- Brody, E. P. (2000). Biological activities of bovine glycomacropeptide. *The British Journal of Nutrition*, 84, Suppl. 1, S39-S46.
- Brück, W. M., Graverholt, G., Gibson, G. R. (2002). Use of batch culture and a two-stage continuous culture system to study the effect of supplemental α -lactalbumin and glycomacropeptide on mixed populations of human gut bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 41, 231-237.
- Brück, W. M., Graverholt, G., Gibson, G. R. (2003a). A two-stage continuous culture system to study the effect of supplemental α -lactalbumin and glycomacropeptide on mixed populations of human gut bacteria challenged with enteropathogenic

- Escherichia coli and Salmonella serotype Typhimurium. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 44-53.
- Brück, W. M., Kelleher, S. L., Gibson, G. R., Nielsen, K. E., Chatterton, D. E. W., Lönnerdal, B. (2003b). rRNA probes used to quantify the effects of glycomacropeptide and α -lactalbumin supplementation on the predominant groups of intestinal bacteria of infant rhesus monkeys challenged with enteropathogenic Escherichia coli. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 37, 273-280.
- Brück, W. M., Kelleher, S. L., Gibson, G. R., Graverholt, G., Lönnerdal, B. (2006a). The effects of α -lactalbumin and glycomacropeptide on the association of Caco-2 cells by enteropathogenic Escherichia coli, Salmonella typhimurium and Shigella flexneri. *FEMS Microbiology Letters*, 259, 158-162.
- Brück, W. M., Redgrave, M., Tuohy, K. M., Lönnerdal, B., Graverholt, G., Hernell, O., Gibson, G. R. (2006b). Effects of bovine α -lactalbumin and casein glycomacropeptide enriched infant formulae on fecal microbiota in healthy term infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 43, 673-679.
- Burton-Freeman, B. M. (2008). Glycomacropeptide (CMP) is not critical to whey-induced satiety, but may have a unique role in energy intake regulation through cholecystokinin (CCK). *Physiology & Behavior*, 93, 379-387.
- Chabance, B., Jollès, P., Izquierdo, C., Mazoyer, E., Francoual, C., Drouet, L., Fiat, A.-M. (1995). Characterization of an antithrombotic peptide from κ -casein in newborn plasma after milk ingestion. *The British Journal of Nutrition*, 73, 583-590.
- Chabance, B., Marteau, P., Rambaud, J. C., Migliore-Samour, D., Boynard, M., Perrotin, P., Guillet, R., Jollès, P., Fiat, A.-M. (1998). Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie*, 80, 155-165.
- Chobert, J. M., Touati, A., Bertrand-Harb, C., Dalgalarondo, M., Nicolas, M.-G. (1989). Solubility and emulsifying properties of kappa casein and its caseinomacropeptide. *Journal of Food Biochemistry*, 13, 457-473.
- Claverol, S., Burlet-Schiltz, O., Gairin, J. E., Monsarrat, B. (2003). Characterization of protein variants and post-translational modifications: ESI-MSn analyses of intact proteins eluted from polyacrylamide gels. *Molecular & Cellular Proteomics*: MCP, 2, 483-493.
- Coolbear, K. P., Elgar, D. F., Ayers, J. S. (1996). Profiling of genetic variants of bovine κ -casein macropeptide by electrophoretic and chromatographic techniques. *International Dairy Journal*, 6, 1055-1068.

- Daddaoua, A., Puerta, V., Zarzuelo, A., Suárez, M. D., Sánchez de Medina, F., Martínez-Augustin, O. (2005). Bovine glycomacropeptide is anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *The Journal of Nutrition*, 135, 1164-1170.
- Delfour, A., Jolles, J., Alais, C., Jolles, P. (1965). Caseino-glycopeptides: Characterization of a methionin residue and of the N-terminal sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 19, 452-455.
- Dziuba, J., Minkiewicz, P. (1996). Influence of glycosylation on micelle-stabilizing ability and biological properties of C-terminal fragments of cow's κ -casein. *International Dairy Journal*, 6, 1017-1044.
- Fanaro, S., Vigi, V. (2002). Protein quality and quantity in infant formulas. A critical look. *Minerva Pediatrica*, 54, 203-209.
- Fosset, S., Fromentin, G., Gietzen, D. W., Dubarry, M., Huneau, J. F., Antoine, J. M., Lang, V., Mathieu-Casseron, F., Tome, D. (2002). Peptide fragments released from Phe-caseinomacropeptide *in vivo* in the rat. *Peptides*, 23, 1773-1781.
- Gauthier, S. F., Pouliot, Y., Saint-Sauveur, D. (2006). Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy Journal*, 16, 1315-1323.
- Guggenheim, B., Schmid, R., Aeschlimann, J. M., Berrocal, R., Neeser, J. R. (1999). Powdered milk micellar casein prevents oral colonization by *Streptococcus sobrinus* and dental caries in rats: a basis for the caries-protective effect of dairy products. *Caries Research*, 33, 446-454.
- Gustafson, D. R., McMahon, D. J., Morrey, J., Nan, R. (2001). Appetite is not influenced by a unique milk peptide:caseinomacropeptide (CMP). *Appetite*, 36, 157-163.
- Holland, J. W., Deeth, H., Alewood, P. F. (2004). Proteomic analysis of κ -casein micro-heterogeneity. *Proteomics*, 4, 743-752.
- Idota, T., Kawakami, H., Nakajima, I. (1994). Bifidus growth-promoting activity effect of N-acetylneuraminic acid-containing substances. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58, 1720-1722.
- Janer, C., Peláez, C., Requena, T. (2004). Caseinomacropeptide and whey protein concentrate enhance *Bifidobacterium lactis* growth in milk. *Food Chemistry*, 86, 263-267.
- Jollès, P., Loucheux-Lefebvre, M. H., Henschen, A. (1978). Structural relatedness of κ -casein and fibrinogen γ -chain. *Journal of Molecular Evolution*, 11, 271-277.

- Jollès, P., Lévy-Toledano, S., Fiat, A. M., Soria, C., Gillessen, D., Thomaidis, A., Dunn, F. W., Caen, J. P. (1986). Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from κ -casein on platelet function. *European Journal of Biochemistry*, 158, 379-382.
- Kanamori, M., Kawaguchi, N., Ibuki, F., Doi H. (1980). Attachment sites of carbohydrate moieties to peptide chain of bovine κ -casein from normal milk. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44, 1855-1861.
- Kawasaki, Y., Isoda, H., Tanimoto, M., Dosako, S., Idota, T., Ahiko, K. (1992). Inhibition by lactoferrin and κ -casein glycomacropeptide of binding of Cholera toxin to its receptor. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56, 195-198.
- Kawasaki, Y., Kawakami, H., Tanimot, M., Dosako, S., Tomizawa, A., Kotake, M., Nakajima, I. (1993a). pH-dependent molecular weight changes of κ -casein glycomacropeptide and its preparation by ultrafiltration. *Milchwissenschaft*, 48, 191-196.
- Kawasaki, Y., Isoda, H., Shinmoto, H., Tanimoto, M., Dosako, S., Idota, T., Nakajima, I. (1993b). Inhibition by κ -casein glycomacropeptide and lactoferrin of influenza virus hemagglutination. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57, 1214-1215.
- Kelleher, S. L., Chatterton, D., Nielsen, K., Lönnerdal, B. (2003). Glycomacropeptide and α -lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 1261-1268.
- Keogh, J. B., Clifton, P. (2008). The effect of meal replacements high in glycomacropeptide on weight loss and markers of cardiovascular disease risk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87, 1602-1605.
- Kim, Y.-J., Park, S., Oh, Y.-K., Kang, W., Kim, H. S., Lee, E. Y. (2005). Purification and characterisation of human caseinmacropeptide produced by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expression and Purification*, 41, 441-446.
- Kreuz, M., Strixner, T., Kulozik, U. (2009). The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinmacropeptide. *Food Hydrocolloids*, 23, 1818-1826.
- Ledoux, N., Mahé, S., Dubarry, M., Bourras, M., Benamouzig, R., Tomé, D. (1999). Intraluminal immunoreactive caseinmacropeptide after milk protein digestion in humans. *Nahrung*, 43, 196-200.
- Léonil, J., Mollé, D. (1990). Liberation of tryptic fragments from caseinmacropeptide of bovine κ -casein involved in platelet function. *Biochemical Journal*, 271, 247-252.

- Li, E. W., Mine, Y. (2004a). Comparison of chromatographic profile of glycomacropeptide from cheese whey isolated using different methods. *Journal of Dairy Science*, 87, 174-177.
- Li, E. W., Mine, Y. (2004b). Immunoenhancing effects of bovine glycomacropeptide and its derivatives on the proliferative response and phagocytic activities of human macrophage like cells, U937. *Journal of Agricultural and Food Science*, 52, 2704-2708.
- Lieske, B., Konrad, G., Kleinschmidt, T. H. (2004). Isolation of caseinmacropeptide from rennet whey by a multi-stage ultrafiltration process. II. Influence of pH and heating on the carbohydrate moiety of glycomacropeptide. *Milchwissenschaft*, 59, 291-294.
- Liu, F., Liao, L., Chen, J. (2008). Preparation of unglycosylated human caseinmacropeptide by engineering DAB Escherichia coli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 889-893.
- López-Expósito, I., Minervini, F., Amigo, L., Recio, I. (2006). Identification of antibacterial peptides from bovine κ -casein. *Journal of Food Protection*, 69, 2992-2997.
- Malkoski, M., Dashper, S. G., O'Brien-Simpson, N. M., Talbo, G. H., Macris, M., Cross, K. J., Reynolds, E. C. (2001). Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 2309-2315.
- Mallee, L., Steijns, J. (2007). Whey protein concentrates from acidic whey: benefits for use in infant formulas. *Agro Food Ind Hi-Tech*, 18, XXIV-XXVI.
- Manso, M. A., Escudero, C., Alijo, M., López-Fandiño, R. (2002). Platelet aggregation inhibitory activity of bovine, ovine and caprine κ -casein macropeptides and their tryptic hydrolysates. *Journal of Food Protection*, 65, 1992-1996.
- Manso, M. A., López-Fandiño, R. (2003). Angiotensin I converting enzyme-inhibitory activity of bovine, ovine and caprine κ -casein macropeptides and their tryptic hydrolysates. *Journal of Food Protection*, 66, 1686-1692.
- Manso, M. A., López-Fandiño, R. (2004). κ -casein macropeptides from cheese whey: physicochemical, biological, nutritional, and technological features for possible uses. *Food Reviews International*, 20, 329-355.
- Marshall, S.C. (1991). Casein macropeptide from whey – A new product opportunity. *Food Research Quarterly*, 51, 86-91.

- Martin-Diana, A. B., Fraga, M. J., Fontecha, J. (2002). Isolation and characterisation of caseinmacropeptide from bovine, ovine, and caprine cheese whey. *European Food Research and Technology*, 214, 282-286.
- Martin-Diana, A. B., Frías, J., Fontecha, J. (2005). Emulsifying properties of whey protein concentrate and caseinmacropeptide of cow, ewe and goat. *Milchwissenschaft*, 60, 363-367.
- Matin, M. A., Otani, H. (2000). Release of cytotoxic glycopeptides from human acid casein fraction by the action of stomach proteinases. *Milchwissenschaft*, 55, 6-10.
- Maubois, J. L., Léonil, J., Trouvé, R., Bouhallab, S. (1991). Les peptides du lait à activité physiologique III. Peptides du lait à effet cardiovasculaire: activités antithrombotique et antihypertensive. *Le Lait*, 71, 249-255.
- Mercier, J.-C., Brignon, G., Ribadeau-Dumas, B. (1973). Structure primaire de la caséine κ -B bovine. Séquence complète. *European Journal of Biochemistry*, 35, 222-235.
- Mercier, J.-C. (1981). Phosphorylation of caseins, present evidence for an amino acid triplet code posttranslationally recognized by specific kinases. *Biochimie*, 63, 1-17.
- Metwally, M. M., El-Shibiny, S., Dieb, S. M. E., El-Etriby, H. M. M., Assem, F. A. (2001). Large scale preparation and growth promoting effects on Bifidobacterium of glycomacropeptide from sweet whey. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 29, 29-36.
- Miguel, M., Manso, M. A., López-Fandiño, R., Alonso, M. J., Salas, M. (2007). Vascular effects and antihypertensive properties of κ -casein macropeptide. *International Dairy Journal*, 17, 1473-1477.
- Mikkelsen, T. L., Frøkiær, H., Topp, C., Bonomi, F., Iametti, F., Picariello, G., Ferranti, P., Barkholt, V. (2005a). Caseinmacropeptide self-association is dependent on whether the peptide is free or restricted in κ -casein. *Journal of Dairy Science*, 88, 4228-4238.
- Mikkelsen, T. L., Backman, S., Sørensen, E. S., Barkholt, V., Frøkiær, H. (2005b). Sialic acid-containing milk proteins show differential immunomodulatory activities depending on sialic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7673-7680.
- Mikkelsen, T. L., Rasmussen, E., Olsen, A., Barkholt, V., Frøkiær, H. (2006). Immunogenicity of κ -casein and glycomacropeptide. *Journal of Dairy Science* 89, 824-830.
- Minkiewicz, P., Slangen, C. J., Lagerwerf, F. M., Haverkamp, J., Rollema, H. S., Visser, S. (1996). Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of

- bovine κ -casein macropeptide and characterization of isolated fractions. *Journal of Chromatography A*, 743, 123-135.
- Mollé, D., Léonil, J. (1995). Heterogeneity of the bovine κ -casein caseinomacropeptide, resolved by liquid chromatography on-line with electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 708, 223-230.
- Monnai, M., Otani, H. (1997). Effect of bovine κ -caseinoglycopeptide on secretion of interleukin-1 family cytokines by P388D1 cells, a line derived from mouse monocyte/macrophage. *Milchwissenschaft*, 52, 192-196.
- Monnai, M., Horimoto, Y., Otani, H. (1998). Immunomodulatory effect of dietary bovine κ -caseinoglycopeptide on serum antibody levels and proliferative responses of lymphocytes in mice. *Milchwissenschaft*, 53, 129-132.
- Moreno, F.J., López-Fandino, R., Olano, A. (2002). Characterization and functional properties of lactosyl caseinomacropeptide conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5179-5184.
- Nakajima, K., Tamura, N., Kobayashi-Hattori, K., Yoshida, T., Hara-Kudo, Y., Ikeda, M., Sugita-Konishi, Y., Hattori, M. (2005). Prevention of intestinal infection by glycomacropeptide. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69, 2294-2301.
- Neeser, J. R., Chambaz, A., Del Vedovo, S., Prigent, M. J., Guggenheim, B. (1988). Specific and nonspecific inhibition of adhesion of oral actinomyces and streptococci to erythrocytes and polystyrene by caseinoglycopeptide derivatives. *Infection and Immunity*, 56, 3201-3208.
- Neeser, J. R., Golliard, M., Woltz, A., Rouvet, M., Gillmann, M. L., Guggenheim, B. (1994). *In vitro* modulation of oral bacterial adhesion to saliva-coated hydroxyapatite beads by milk casein derivatives. *Oral Microbiology and Immunology*, 9, 193-201.
- Ney, D. M., Hul, A. K., van Calcar, S. C., Liu, X., Etzel, M. R. (2008). Dietary glycomacropeptide supports growth and reduces the concentrations of phenylalanine in plasma and brain in a murine model of phenylketonuria. *The Journal of Nutrition*, 138, 316-322.
- Oh, S., Worobo, R. W., Kim, B., Rheem, S., Kim, S. (2000). Detection of cholera toxin-binding activity of κ -casein macropeptide and optimization of its production by the response surface methodology. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64, 516-522.
- Otani, H., Monnai, M., Hosono, A. (1992). Bovine κ -casein as inhibitor of the proliferation of mouse splenocytes induced by lipopolysaccharide stimulation. *Milchwissenschaft*, 47, 512-515.

- Otani, H., Monnai, M. (1993). Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes by bovine κ -casein digests. *Food and Agricultural Immunology*, 5, 219-229.
- Otani, H., Hata, I. (1995). Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes and rabbit Peyer's patch cells by bovine milk caseins and their digests. *Journal of Dairy Research*, 62, 339-348.
- Otani, H., Monnai, M. (1995). Induction of an interleukin-1 receptor antagonist-like component produced from mouse spleen cells by bovine κ -caseinoglycopeptide. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59, 1166-1168.
- Otani, H., Monnai, M., Kawasaki, Y., Kawakami, H., Tanimoto, M. (1995). Inhibition of mitogen-induced proliferative responses of lymphocytes by bovine κ -caseinoglycopeptides having different carbohydrate chains. *Journal of Dairy Research*, 62, 349-357.
- Otani, H., Horimoto, Y., Monnai, M. (1996). Suppression of interleukin-2 receptor expression on mouse CD4+T cells by bovine κ -caseinoglycopeptide. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60, 1017-1019.
- Otani, H., Horimoto, Y., Matin, M. A., Ohnuki, H., Kawahara, T. (2005). Effect of bovine κ -caseinoglycopeptide on mitogen-induced proliferative responses of spleen cells from different strains of mice. *Milchwissenschaft*, 60, 245-248.
- Pedersen, N. L. R., Nagain-Domaine, C., Mahe, S., Chariot, J., Roze, C., Tome, D. (2000). Caseinomacropeptide specifically stimulates exocrine pancreatic secretion in the anesthetized rat. *Peptides*, 21, 1527-1535.
- Pisano, A., Packer, N. H., Redmond, J. W., Williams, K. L., Gooly, A. A. (1994). Characterization of O-linked glycosylation motifs in the glycopeptide domain of bovine κ -casein. *Glycobiology*, 4, 837-844.
- Pizzano, R., Nicolai, M. A., Manzo, C., Giannattasio, M., Addeo, F. (2005). Human IgE binding to the glycosidic moiety of bovine κ -casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7971-7975.
- Prinzenberg, E. M., Krause, I., Erhardt, G. (1999). SSCP analysis at the bovine CSN3 locus discriminates six alleles corresponding to known protein variants (A, B, C, E, F, G) and three new DNA polymorphisms (H, I, A(1)). *Animal Biotechnology*, 10, 49-62.
- Qian, Z.-Y., Jollès, P., Migliore-Samour, D., Schoentgen, F., Fiat, A.-M. (1995). Ovine κ -casein peptides inhibit platelet aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1244, 411-417.

- Rasmussen, L. K., Sorensen, E. S., Petersen, T. E., Nielsen, N. C., Thomsen, J. K. (1997). Characterization of phosphate sites in native ovine, caprine, and bovine casein micelles and their caseinomacropeptides: a solid state phosphorus-31 nuclear magnetic resonance and sequence and mass spectrometric study. *Journal of Dairy Science*, 80, 607-614.
- Requena, P., Daddaoua, A., Martínez-Plata, E., González, M., Zarzuelo, A., Suárez, M. D., Sánchez de Medina, F., Martínez-Augustin, O. (2008). Bovine glycomacropeptide ameliorates experimental rat ileitis by mechanisms involving downregulation of interleukin 17. *British Journal of Pharmacology*, 154, 825-832.
- Rhoades, J. R., Gibson, G. R., Formentin, K., Beer, M., Greenberg, N., Rastall, R. A. (2005). Caseinglycomacropeptide inhibits adhesion of pathogenic *Escherichia coli* strains to human cells in culture. *Journal of Dairy Science*, 88, 3455-3459.
- Rigo, J., Boehm, G., Georgi, G., Jelinek, J., Nyambugabo, K., Sawatzki, G., Studzinski, F. (2001). An infant formula free of glycomacropeptide prevents hyperthreoninemia in formula-fed preterm infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 32, 127-130.
- Royle, P. J., McIntosh, G. H., Clifton, P. M. (2008). Whey protein isolate and glycomacropeptide decrease weight gain and alter body composition in male Wistar rats. *The British Journal of Nutrition*, 100, 88-93.
- Rutherford, K. J., Gill, H. S. (2000). Peptides affecting coagulation. *The British Journal of Nutrition*, 84, S99-S102.
- Saito, T., Yamaji, A., Itoh, T. (1991). A new isolation method for caseinoglycomacropeptide from sweet cheese whey. *Journal of Dairy Science*, 74, 2831-2837.
- Saito, T., Itoh, T. (1992). Variations and distributions of O-glycosidically linked sugar chains in bovine κ -casein. *Journal of Dairy Science*, 75, 1768-1774.
- Sandström, O., Lönnerdal, B., Graverholt, G., Hernell, O. (2008). Effects of α -lactalbumin-enriched formula with different levels of glycomacropeptide on infant nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87, 921-928.
- Strömquist, M., Falk, P., Bergström, S., Hansson, L., Lönnerdal, B., Normark, S., Hernell, O. (1995). Human milk κ -casein and inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucosa. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 21, 288-296.
- Schupbach, P., Neeser, J. R., Golliard, M., Rouvet, M., Guggenheim, B. (1996). Incorporation of caseinoglycomacropeptide and caseinophosphopeptide into the

- salivary pellicle inhibits adherence of mutans streptococci. *Journal of Dental Research*, 75, 1779-1788.
- Takeuchi, M., Tsuda, E., Yoshikawa, M., Sasaki, R., Chiba, H. (1985). Fractionation and characterisation of 9 subcomponents of bovine κ -casein A. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49, 2269-2276.
- Talbo, G. H., Suckau, D., Malkoski, M., Reynolds, E. C. (2001). MALDI-PSD-MS analysis of the phosphorylation sites of caseinomacropeptide. *Peptides*, 22, 1093-1098.
- Thomä, C., Kulozik, U. (2004). Methods of obtaining isolated caseinomacropeptide from milk and whey and functional properties. *Bulletin of the IDF*, 389, 74-77.
- Thomä-Worringer, C., Sørensen, J., López-Fandiño, R. (2006). Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *International Dairy Journal*, 16, 1324-1333.
- Vacca Smith, A. M., Bowen, W. H. (2000). The effects of milk and κ -casein on salivary pellicle formed on hydroxyapatite discs in situ. *Caries Research*, 34, 88-93.
- Vreeman, H. J., Visser, S., Slangen, C. J., Van Riel, J. A. M. (1986). Characterization of bovine κ -casein fractions and the kinetics of chymosin-induced macropeptide release from carbohydrate-free and carbohydrate-containing fractions determined by high-performance gel-permeation chromatography. *Biochemical Journal*, 240, 87-97.
- Wang, B., Brand-Miller, J., McVeagh, P., Petocz, P. (2001). Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 510-515.
- Wang, B., Staples, A., Sun, Y., Karim, M., Brand-Miller, J. (2004). Effect of dietary sialic acid supplementation on saliva content in piglets. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13, S75.
- Wang, B., Yu, B., Karim, M., Hu, H. H., Sun, Y., McGreevy, P., Petocz, P., Held, S., Brand-Miller, J. (2007). Dietary sialic acid supplementation improves learning and memory in piglets. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85, 561-569.
- Wong, P. Y. Y., Nakamura, S., Kitts, D. D. (2006). Functional and biological activities of casein glycomacropeptide as influenced by lipophilization with medium and long chain fatty acid. *Food Chemistry*, 97, 310-317.
- Xu, Y., Sleight, R., Hourigan, J., Johnson, R. (2000). Separation of bovine immunoglobulin G and glycomacropeptide from dairy whey. *Process Biochemistry*, 36, 393-399.

- Yvon, M., Beucher, S., Guilloteau, P., Le Huerou-Luron, I., Corring, T. (1994). Effects of caseinomacropeptide (CMP) on digestion regulation. *Reproduction, Nutrition, Development*, 34, 527-537.
- Zevaco, C., Ribadeau-Dumas, B. (1984). A study on the carbohydrate binding sites of bovine κ -casein using high performance liquid chromatography. *Milchwissenschaft*, 39, 206-210.

Componentes bioactivos de la grasa láctea

Manuela Juárez y Javier Fontecha

Departamento de Ciencia y Tecnología de Productos Lácteos

Instituto del Frío (CSIC). C/ Jose Antonio Novais, 10. 28040 Madrid

Tel: +34 91 549 2300. Fax: +34 91 549 3627

E-mail: mjuarez@if.csic.es; jfontecha@if.csic.es

1. Introducción

Históricamente la grasa láctea ha sido uno de los constituyentes más importantes de la leche en cuanto a su valor nutricional, a la aptitud tecnológica y palatabilidad que aporta a los productos lácteos. Sin embargo, como consecuencia de su contenido en ácidos grasos saturados y colesterol, se ha castigado a la grasa láctea hasta situarla al mismo nivel que otras grasas de origen animal, observándose año tras año una disminución continuada en la tendencia de consumo de este producto.

No obstante, con las herramientas de investigación disponibles, en las últimas décadas se ha documentado la presencia en grasa láctea de distintos compuestos lipídicos que ejercen una importante actividad biológica. Entre los componentes lipídicos y ácidos grasos bioactivos presentes cabe destacar el ácido **butírico**, el ácido **linoleico conjugado** (CLA), constituyentes de la membrana del glóbulo de grasa como **esfingolípidos**, vitaminas liposolubles, etc. Estos compuestos ofrecen una potencial aplicación comercial en el desarrollo de alimentos funcionales, encaminados a la promoción de la salud humana y/o en la prevención de enfermedades.

Con vistas a potenciar la actividad y por tanto los beneficios del consumo de estos componentes, se están llevando a cabo estudios dirigidos a incrementar su contenido de forma natural en productos lácteos enriquecidos, o bien su aislamiento para posterior utilización como ingredientes funcionales. El conocimiento en profundidad de

los mecanismos que regulan los contenidos de estos componentes con actividad biológica y el efecto potencialmente beneficioso de su consumo, es esencial para incrementar el valor añadido de estos productos.

Los lípidos en la leche están presentes en forma de glóbulos, con un núcleo hidrofóbico, que consiste principalmente en triglicéridos, rodeado por una membrana compuesta mayoritariamente por fosfolípidos y glicoproteínas. La biodisponibilidad de estos nutrientes se ve favorecida por su elevada digestibilidad. Los lípidos en la leche son además los transportadores de importantes vitaminas liposolubles como la vitamina A, D, E y K, así como carotenoides.

2. Composición en ácidos grasos.

Durante décadas, las investigaciones realizadas en grasa láctea tienen relación principalmente con su contenido en ácidos grasos, por ser estos los componentes más abundantes de la fracción lipídica. No obstante, son también los que presentan una mayor variabilidad, ya que como es conocido, el perfil de ácidos grasos puede sufrir importantes variaciones como consecuencia de la dieta del ganado.

En cuanto a su composición, la grasa láctea es muy compleja, con cerca de 400 ácidos grasos diferentes, de 4 a 26 átomos de carbono, aunque solo un número próximo a 30 está en una proporción superior al 0,1% y el resto están presentes en cantidad de trazas. Los ácidos grasos, saturados (AGS) o insaturados (con uno a cuatro dobles enlaces), son mayoritariamente de número par de átomos de carbono aunque también se encuentran AGS con número impar, aproximadamente un 2% y una proporción similar de AGS de cadena metil-ramificada de número par e impar de átomos de carbono. La tabla 1 recoge los principales ácidos grasos de la leche de vaca. En la leche de las distintas especies más difundidas para consumo hay diferencias notables en el contenido de algunos ácidos grasos, que influyen en el gusto de los productos elaborados (tal como el

queso). En esta línea destaca el contenido en los ácidos caprílico y cáprico que puede ser 2-3 veces mayor en las leches de oveja y cabra.

Tabla 1. Valores medios de los contenidos en ácidos grasos mayoritarios de la grasa de leche (% total de ácidos grasos) †

Ácido graso	Valor medio
Butírico (C _{4:0})	3.9
Caproico (C _{6:0})	2.5
Caprílico (C _{8:0})	1.5
Cáprico (C _{10:0})	3.2
Decenoico (C _{10:1})	0.2
Laúrico (C _{12:0})	3.6
Tridecanoico (C _{13:0})	0.2
Mirístico (C _{14:0})	11.1
<i>iso</i> Pentadecanoico (iC _{15:0})	0.4
<i>anteiso</i> Pentadecanoico (aiC _{15:0})	0.4
Miristoleico (C _{14:1})	0.8
Pentadecanoico (C _{15:0})	1.2
<i>iso</i> Palmítico (iC _{16:0})	0.4
Palmítico (C ₁₆)	27.9
<i>iso</i> Heptadecanoico (iC _{17:0})	0.5
<i>anteiso</i> Heptadecanoico (aiC _{17:0})	0.5
Palmitoleico (C _{16:1})	1.5
Heptadecanoico (C _{17:0})	0.6
Heptadecenoico (C _{17:1})	0.4
Esteárico (C _{18:0})	12.2
Oleico* (C _{18:1})	17.2
<i>trans</i> Octadecenoico (C _{18:1})	3.9
Linoleico* (C _{18:2})	1.4
Eicosanoico (C _{20:0})	0.4
Linolénico* (C _{18:3})	1.0
Linoleico conjugado * (C _{18:2})	1.1

* Todos los isómeros

†McGibbon y Taylor (2006).

El alto contenido en AGS de la grasa de leche (~65%) (Tabla 1), la ha situado entre las primeras de la lista a ser sustituida o eliminada de las recomendaciones dietéticas en las sociedades industrializadas, al relacionar su consumo con el aumento de colesterol total y otros marcadores plasmáticos de enfermedades cardiovasculares (ej. LDL-colesterol). No obstante, conviene indicar que solo un tercio de los ácidos grasos presentes en la leche, correspondiente a la concentración de los AGS C12, C14 y C16, podrían considerarse desfavorables, si se produce un consumo excesivo (Legrand,

2008). Estudios realizados para determinar el efecto de estos AGS de manera independiente, frente al que se considera el mejor indicador de enfermedad cardiovascular (CVD), colesterol total/HDL-colesterol, se ha documentado que el C12 se comporta de manera significativamente positiva, disminuyendo dicho indicador, el C14 también muestra una tendencia hacia su disminución y el C16 lo aumenta (Mensink y col., 2003; Steijns, 2008). Una explicación a las discrepancias encontradas entre los diferentes estudios, frente a los marcadores de CVD, es debida al uso de fórmulas que incorporan grasas sintéticas, con ácidos grasos esterificados al azar. En contraste, en la grasa láctea, la distribución de los ácidos grasos en los triglicéridos (TG) es relativamente constante y característica. La mayoría de los AGS se localizan en la posición *sn*-2 del TG (principalmente el ácido palmítico, C16:0), los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) se encuentran mayoritariamente en posición *sn*-3, el esteárico y oleico en *sn*-1 y *sn*-3 (Jensen, 2002). La acción de las lipasas lingual, gástrica y pancreática, estereoespecíficas de los enlaces *sn*-1 y *sn*-3, contribuye a la liberación de AGCC. Estudios realizados con los monoglicéridos derivados *sn*-2, indican que se acomplejan con el calcio de la leche, lo que permite que su absorción se produzca de una manera mas eficaz (Mensink, 2005). Por otra parte, la exclusiva presencia en grasa láctea de AGS de cadena corta, butírico (C4), caproico (C6) y de cadena media, caprílico (C8) y cáprico (C10), que constituyen del 8 al 12 % del total, no tienen efecto sobre los niveles del colesterol en sangre (Parodi, 2004). Además, la presencia de estos AGCC, supone un elevado contenido en TG de cadena corta y media, lo que favorece su punto de fusión más bajo. Estas diferentes propiedades químicas y físicas, frente a otras grasas animales saturadas, afectan de manera positiva su digestibilidad y favorece su biodisponibilidad. El ácido esteárico (C18) con una media del 12%, es considerado neutro desde la perspectiva de la salud humana, aunque sin duda es tan efectivo para reducir el colesterol plasmático como el ácido oleico (C18:1), también presente en grasa láctea en concentraciones altas, del 15 al

23%. Es de interés, asimismo, considerar la importante presencia de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) linoleico (C18:2), y α -linolénico (C18:3), con un 1,5% y 1% respectivamente, de reconocido efecto positivo para la salud cardiovascular. Por último, señalar que la grasa láctea es la principal fuente de CLA de nuestra dieta, considerado como un potente agente anticancerígeno natural (Parodi, 2008).

La grasa de leche tiene además ácidos metil-ramificados, sobre todo la leche de cabra, cuya relevancia se debe fundamentalmente a sus propiedades anticancerígenas descritas en cultivos de células tumorales, su influencia en el punto de fusión de la grasa láctea y por su utilidad en estudios clínicos como marcadores del consumo humano de grasa láctea, al no encontrarse en otras grasas animales (Vlaeminck y col., 2006).

Por todo ello, en los últimos años se han realizado investigaciones que han dado lugar a un número creciente de publicaciones, encaminadas a reconsiderar la significativa actividad biológica de los ácidos grasos presentes en la leche, en relación con la salud humana (Parodi, 2004; IDF, 2005; German y Dillar, 2006; Akaln y col., 2006; IDF, 2007; Steijns, 2008; Lecerf, 2008).

2.1. Ácidos grasos de cadena corta y media.

Como se ha indicado anteriormente, de todos los alimentos y matrices lipídicas alimentarias, la grasa láctea es la única que contiene concentraciones substanciales de ácidos grasos de cadena corta y media (C4 a C10). Los TG de estos ácidos grasos de la dieta se hidrolizan en nuestro organismo y se absorben desde el intestino al sistema circulatorio sin resíntesis de TG. Son además, empleados como fuente de energía rápida, por lo que tienen baja tendencia a acumularse en tejido adiposo (Molkentin, 2000). El principal exponente de esta fracción es el ácido butírico (C4:0), ya que constituye entre un 2-5 % del total de ácidos grasos aunque en leche humana representa un contenido muy inferior, aproximadamente un 0,4%. Este ácido se ha

descrito como un agente antitumoral por inhibir el crecimiento y la diferenciación de células tumorales prostáticas (Maier y col., 2000), mamarias (Coradini y col., 1997) y colónicas (Wolter y Stein, 2002), así como por favorecer su apoptosis en animales de experimentación. (Hassig y col., 1997; German, 1999). El ácido butírico parece además actuar de forma sinérgica con otros componentes de la dieta como resveratrol y retinol entre otros (Wolter y Stein, 2002) o fármacos específicos utilizados para el tratamiento de la hipercolesterolemia (incluida la aspirina, Menzel y col., 2002), por lo que no serían necesarias concentraciones plasmáticas muy elevadas para proporcionar un efecto beneficioso (Parodi, 2004).

En nuestro organismo el ácido butírico (junto con acético y propiónico) se obtiene de la fermentación de la fibra de la dieta por la microflora del colon. El efecto potencialmente positivo que frente al cáncer de colon tiene el consumo de fibra dietética, parece relacionarse con la presencia y formación del ácido butírico.

Al igual que el ácido butírico, el ácido caproico, caprílico y cáprico (C6, C8 y C10) se encuentran casi exclusivamente en la grasa láctea en concentraciones entre 1 y 3 % cada uno, en leche de vaca, aunque en leche humana se encuentran entre 0.1 y 0.3 %. En leches de oveja y cabra los niveles pueden llegar a ser más del doble que en leche de vaca. Para estos ácidos se han descrito actividades antibacterianas y antiviricas tanto en ensayos *in vitro* como en animales de experimentación. Se ha demostrado en estudios con niños de 1-2 años que al ser alimentados con leche entera, sufrían 5 veces menos trastornos gastrointestinales que los alimentados con leche de reducido contenido en grasa. De ellos cabe destacar la monocaprina (monoglicérido del ácido cáprico, obtenido de la digestión del TG) por su actividad anti HIV (Thormar y col., 1994; Hilmarsson y col., 2006).

2.2. Ácido linoleico conjugado (CLA).

El CLA es una mezcla de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico, que se encuentran de forma predominante en productos derivados de rumiantes. Se forman debido a los procesos de biohidrogenación bacteriana de los AGPI de la dieta por los microorganismos presentes en el rúmen. El contenido de CLA en la leche varía considerablemente, pero puede constituir alrededor del 0,6% del total de ácidos grasos. El isómero *cis*-9, *trans*-11 C18:2 es el más abundante y representa aproximadamente el 75% del total de CLA. Otros isómeros del CLA, están presentes en pequeñas cantidades, como el *trans*-7, *cis*-9 C18:2 (5-10%) y *trans*-10, *cis*-12 C18:2 (0,2%), presentan diferentes efectos biológicos. Desde los primeros estudios que demostraban el efecto anticancerígeno del CLA, por la inhibición de tumores epiteliales en animales de experimentación (Ha y col., 1987), el CLA y en particular el isómero mayoritario *cis*-9, *trans*-11 C18:2 denominado ácido ruménico (RA), ha constituido el objetivo de multitud de estudios que determinan sus propiedades bioquímicas y fisiológicas (Parodi, 2008). Destacan los resultados de estudios *in vitro* y en modelos animales que sugieren que el RA es responsable de procesos antiaterogénicos y anticancerígenos, así como un gran número de otros efectos potencialmente beneficiosos para la salud humana (Ip y col., 2003; Parodi, 2004; Battacharya y col., 2006; Yurawecz y col., 2006). La información disponible sobre los efectos del CLA en el metabolismo de células cancerígenas en cultivo, así como su actividad anti-proliferativa y pro-apoptótica (Ochoa y col, 2004), hacen del CLA un potencial agente muy interesante para una posible terapia del cáncer. Así, un reciente estudio prospectivo sugiere que una ingesta elevada de CLA mediante el consumo de productos lácteos con alto contenido en grasa, puede reducir el riesgo de cáncer colorrectal (Larsson y col., 2005).

Son muchos los posibles mecanismos metabólicos implicados en esta actividad anticancerígena del CLA. Se ha sugerido que el CLA compite con el ácido

araquidónico (C20:4) en la reacción de la ciclooxigenasa, lo que reduce la concentración de prostaglandinas y tromboxanos de la serie 2 (Akahoshi y col., 2004). El CLA puede suprimir la expresión de genes de la ciclooxigenasa y reducir la liberación de citoquinas pro-inflamatorias tales como TNF-alfa e interleukina en animales (Akahoshi y col., 2004). El CLA también parece activar los factores de transcripción PPARs, reducir el paso inicial en la activación del NF-kappa B y por tanto reducir las citoquinas, moléculas de adhesión, y de otros tipos de moléculas inducidas por estrés (Cheng y col., 2004).

Como se ha indicado, además del isómero mayoritario RA, otros isómeros de CLA se han asociado con diversos procesos metabólicos relacionados con la salud. Así el *trans*-10, *cis*-12 C18:2, ha alcanzado una gran relevancia por promover la pérdida de peso corporal (Belury, 2002; Pariza, 2004), aunque podría ser también el causante de la disminución en los niveles de glucosa e incrementos de resistencia a insulina plasmática (Riserus 2002; Khanal y Dhiman, 2004). El *cis*-9 *cis*-11 C18:2 ha sido ensayado en cultivos celulares de cáncer de mama y parece comportarse como un agente bloqueador de estrógeno humano, mientras que el *trans*-9 *trans*-11 C18:2 parece ejercer un potente efecto inhibidor del crecimiento de células de cáncer de colon.

Aunque los estudios en humanos no son muy abundantes, en los últimos años se están realizando ensayos clínicos utilizando mezclas de isómeros de CLA. Así, Tricon y col. (2004) han demostrado que la incorporación a la dieta de personas sanas de una mezcla de isómeros de CLA (*cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12) afecta de forma positiva a la relación de los lípidos plasmáticos, especialmente el isómero *cis*-9, *trans*-11, que causa una reducción significativa en la concentración de colesterol total y de TG. El papel del isómero *trans*-10, *cis*-12 en los ensayos realizados no parece ser tan positivo para los indicadores plasmáticos de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, en este ámbito, se necesita investigación adicional.

2.3. Ácidos Grasos *Trans*. Ácido Vacénico (TVA).

El ácido vacénico (*trans*-11 C18:1) (TVA) es el principal isómero *trans* presente en grasa láctea, alcanzando más del 60% del total de isómeros *trans*. Su concentración en la grasa total puede variar entre el 2-5 %, cuando el rumiante consume pastos frescos o suplementos ricos en AGPI, y en torno al 1-2% en estabulación con dieta de pienso. Como se ha demostrado por Kay y col. (2004) aproximadamente el 90% del isómero *cis*-9, *trans*-11 CLA de la grasa de leche se produce por vía endógena en la glándula mamaria, con la participación de la delta-9-desaturasa a partir del TVA, su precursor fisiológico. Se ha documentado además que esa conversión puede darse también en células de roedores (Santora y col., 2000), cerdos (Glaser y col., 2002) y humanas (Turpeinen y col., 2002).

Los ácidos grasos *trans* producidos industrialmente a partir de aceites vegetales y de pescado parcialmente hidrogenados, han demostrado en conjunto aumentar el riesgo de enfermedades coronarias, ya que tienen influencia adversa sobre la relación de LDL/HDL (Lichtenstein y col., 2003; Mensink & Katan 1990; Ascherio y col., 1999). El perfil de estos isómeros de ácidos *trans* tiene una distribución tipo “gaus” con niveles altos de los isómeros *trans*-9, *trans*-10 y *trans*-11, muy diferente del perfil presente en la grasa de leche. No obstante, algunos trabajos han cuestionado si el TVA tiene esos mismos efectos adversos. Así, Meijer y col. (2001) encontró que TVA fue más perjudicial para el riesgo cardiovascular que el ácido elaídico (*trans*-9 C18:1) debido a que provocaba un mayor aumento de la relación LDL/HDL. Además, Clifton y col. (2004) demostraron que el TVA actúa como marcador independiente del infarto de miocardio. En contraste con estos resultados, se ha demostrado más recientemente que los ácidos *trans* de origen animal no dan lugar a un mayor riesgo de cardiopatía coronaria (Willett y col., 2006; Willett y Mozaffarian, 2008) y que además el consumo medio en una dieta europea es bajo, con una contribución de alrededor del 0.7% del total energético. En esta misma línea, Tricon y col. (2006), demostraron que un

aumento de la concentración de TVA y *cis*-9, *trans*-11 CLA en la grasa láctea no se relaciona con efectos perjudiciales en la mayoría de las enfermedades cardiovasculares. Por todo ello, sigue siendo necesario la realización de más estudios para aclarar los efectos que sobre los lípidos sanguíneos producen los distintos isómeros *trans*-C18:1 (IDF, 2005).

La utilización de suplementos ricos en AGPI en la dieta del ganado, es una de las estrategias que ha resultado ser eficaz destinada a elevar el contenido de ácidos grasos insaturados y la concentración de CLA así como de su precursor fisiológico, TVA, en la grasa de leche, sin modificar el resto de los ácidos *trans*-monoinsaturados (Fuente y Juárez 2004; Luna y col., 2005; Jenkins y McGuire 2006).

3. Colesterol lácteo.

La grasa láctea es una de las fuentes de colesterol de la dieta, con un contenido medio de 260-270 mg/100g de grasa. Tras varias décadas de controversia sobre el colesterol de los alimentos y su relación con CVD, actualmente los estudios clínicos coinciden en señalar, que la absorción del colesterol de la dieta (colesterol exógeno) es muy ineficiente. Es decir, el consumo de alimentos ricos en colesterol no presenta efectos significativos sobre la relación de lipoproteínas plasmáticas LDL y HDL, cuyo nivel entre otros factores, depende principalmente de la composición en ácidos grasos de los lípidos de la dieta (McNamara, 2000). Conviene resaltar que además de la dieta, hay numerosos factores implicados en la regulación de los niveles de colesterol en suero sanguíneo, entre los que la tensión nerviosa, actividad física y el estado emocional, juegan el papel más relevante (Cooper y col., 1992).

Sin embargo, algunos nutricionistas y en particular muchos consumidores (influidos por ciertos tipos de publicidad), demandan productos libres de colesterol, lo que fuerza a los fabricantes a producir alimentos que contengan tan poco colesterol como sea posible.

Con este fin, en algunas legislaciones se obliga a que el contenido en colesterol figure en la información nutricional de los alimentos.

4. Fosfolípidos

La membrana del glóbulo graso de la leche esta compuesta de los lípidos y proteínas de las células epiteliales de la glándula mamaria de la que proceden, e incluyen cantidades significativas de fosfolípidos (PLs) y colesterol. Aunque los PLs constituyen un porcentaje pequeño de los lípidos totales (0,5-1% en leche de vaca y 0,3% en leche humana) se encuentran altamente implicados en el metabolismo celular debido a su carácter lipofílico e hidrofílico. Entre los PLs presentes en el glóbulo graso, destacan la fosfatidilcolina (PC) 35%, fosfatidiletanolamina (PE) 30%, esfingomieline (SM) 25%, fosfatidilinositol (PI) 5% y fosfatidilserina (PS) 3% (Christie, 1995; Jensen, 2002).

Entre las actividades biológicas descritas para los PLs destacan su carácter antioxidante (Frede y col., 1990; Saito e Ishihara, 1997), propiedades antimicrobianas y antivirales (van Hooijdonk y col., 2000), así como efectos protectores frente a la úlcera gástrica (Kivinen y col., 1992). Estudios recientes han demostrado que los PLs parecen desarrollar importantes funciones como agentes activos frente al cáncer de colon, frente a patógenos gastrointestinales y frente a enfermedades como Alzheimer, depresión y estrés (Spitsberg, 2005). Parecen además tener un efecto nutricional positivo en la reducción del riesgo de CVD (Pfeuffer y Schrezenmeir 2001). Todo ello ha permitido considerar la membrana del glóbulo graso como un potencial nutracéutico.

El suero de mantequilla, también denominado mazada, es particularmente rico en PLs. La lipasa pancreática hidroliza los PLs de la dieta en lisofosfolípidos y ácidos grasos. Algunas de estas lisoformas de PLs se han descrito como altamente bioactivas, ya que inducen, mediante procesos surfactantes, la lisis de bacterias Gram-positivas. Estos

efectos líticos han sido comprobados con PC, PE y sus lisoformas tanto en cultivos celulares como en ratas alimentadas con mazada en polvo (Sprong y col., 1999). Además, se ha ensayado con éxito la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* en ratas infectadas, mediante la aplicación de PC.

Entre los PLs, destacan por su importancia los esfingolípidos, que incluyen a esfingomielinas, cerebrósidos, globósidos y gangliósidos así como a sus productos de digestión (ceramidas y esfingosinas). Todos ellos son moléculas de elevada actividad, con importantes efectos en la regulación celular y en los indicadores plasmáticos ya que reducen el nivel de LDL y elevan HDL-colesterol en suero (Kobayashi y col., 1997). Son además componentes fundamentales en el mantenimiento de la estructura de la membrana (generan “microdominios”), que modulan el comportamiento de algunos receptores, como los del factor de crecimiento, y sirven como centros de unión para algunos microorganismos, toxinas microbianas y virus (Vesper y col., 1999). Hay evidencia experimental de que el consumo de esfingolípidos inhibe los estados tempranos de cáncer de colon, en ratones (Schmelz y col., 2000). Además los productos de digestión de los esfingolípidos (ceramidas y otras esfingo formas) son sustancias muy activas que regulan el crecimiento celular su diferenciación y apoptosis, procesos que se pierden en células tumorales (Merrill y col., 2001). Todos estos resultados avalan a los esfingolípidos como componentes con una elevada actividad funcional en alimentos.

Las esfingomielinas, que destacan por su localización en las membranas de las células plamáticas y del tejido nervioso, representan un tercio de los PLs de leche bovina (Pfeuffer y Schrezenmeir, 2001) y un 38% de leche humana (Motouri y col., 2003). Aunque ya se había descrito que la esfingomielina de la leche parecía estar relacionada con la regulación de la absorción de colesterol por las membranas de células intestinales (Chen y col., 1992), más recientemente se ha comprobado que cuando la esfingomielina es incluida en la dieta incluso al 0,1 %, reduce

significativamente la absorción de colesterol en ratones (Eckhardt y col., 2002). Los inmediatos precursores de esfingomielinas y glicoesfingolípidos, las ceramidas, se han propuesto como importantes agentes mediadores de las señales en cascada en procesos de apoptosis, proliferación y respuestas de estrés celular (Hannun y Obeid, 2002; Spiegel y Milstien, 2002).

No obstante, es conveniente indicar que la fracción de PLs no está suficientemente estudiada y que en la industria alimentaria se utiliza mayoritariamente como emulsionante, formando complejos con proteínas (McCrae, 1999).

5. Grasa láctea y enfermedades cardiovasculares

En la actualidad, las recomendaciones dietéticas reconocen la contribución de la leche y los productos lácteos a una dieta saludable, ya que su consumo implica elevar los niveles de múltiples nutrientes (calcio, potasio, magnesio, zinc, riboflavina, vitamina A, folato, vitamina D y proteínas de elevada calidad nutricional), no obstante, se hace hincapié en recomendar el consumo preferente de productos lácteos desnatados o con reducido contenido en grasa. Por otra parte, las autoridades sanitarias de los países industrializados, aseguran que existe una relación clara entre el consumo de grasas saturadas y colesterol, con las enfermedades crónicas coronarias y la obesidad (FAO/WHO, 2003). Estas recomendaciones están basadas fundamentalmente en los trabajos realizados hace 50 años que asumían que una dieta rica en grasas saturadas y colesterol eran los factores únicos para aumentar el colesterol sérico implicado en el desarrollo de aterosclerosis (Keys y col., 1957). La hipótesis “dieta-corazón”, desarrollada en esos momentos para evitar el avance de las CVD y que coloquialmente ha llegado hasta nuestros días como hipótesis lipídica, se basa en que las plaquetas y las arterias humanas contienen colesterol, por lo que dietas ricas en colesterol incrementarían el colesterol sérico (CS) desencadenando enfermedades cardiovasculares. Las grasas animales, entre las que se encuentra la

grasa láctea, debían ser consideradas factores aterogénicos muy potentes y se recomendaba evitar en lo posible su consumo. En este contexto, se iniciaron relevantes estudios encuadrados en la denominada epidemiología cardiovascular, representada por el “Estudio Framingham” y el “Estudio de los Siete Países”, entre otros (Kannel y col., 1970; Keys y col., 1980). Las conclusiones obtenidas de los resultados de estos estudios junto con los trabajos clínicos y epidemiológicos desarrollados durante las últimas décadas, complementados por los avances analíticos, han permitido empezar a comprender el metabolismo de los lípidos de la dieta y su papel en la salud, lo que ha puesto en duda las hipótesis lipídicas anteriormente citadas. Hoy en día, es bien conocido que el organismo de un individuo sano cuenta con mecanismos de regulación del colesterol sérico muy finos, donde una ligera señal de aumento detiene su producción en el hígado, por lo que el colesterol sérico se afecta de forma muy limitada por el nivel de colesterol de la dieta. Por otra parte, se reconoce la importancia de utilizar las relaciones entre los indicadores de CVD. La relación “HDL-colesterol/LDL-colesterol” o bien “HDL-colesterol/colesterol total” pueden ser utilizadas con éxito como indicadores de riesgo CVD. El consumo de AGS produce un incremento tanto de LDL- como de HDL-colesterol por lo que la relación HDL-colesterol/LDL-colesterol no sufre grandes alteraciones. No obstante, el consumo de ácidos grasos *trans* presentes en aceites vegetales hidrogenados, disminuye significativamente la relación HDL/LDL-colesterol (Maijala, 2000). En lo que respecta a la grasa láctea, no existe ninguna evidencia científica clara en cuanto a la incidencia negativa del conjunto de los AGS, ni tampoco se ha podido demostrar fehacientemente una correlación positiva entre el consumo de leche y productos lácteos y el incremento de CVD. Sin embargo, el mensaje de consumir productos con reducido contenido en grasa sigue vigente, con el consiguiente descenso en el consumo de leche entera en las poblaciones industrializadas y el desarrollo de productos lácteos donde su grasa ha sido sustituida por aceites vegetales o de

pescado. No obstante, algunos autores de reconocido prestigio mantienen que una dieta baja en grasa saturada no es la mejor para evitar CVD (German y Dillard 2004; Ravnskov, 1999). Estos autores inciden en la importancia metabólica de incorporar en la ingesta todos los tipos de AG (AGS, AGMI, AGPI), ya que todos forman parte esencial de nuestros tejidos, órganos y membranas celulares y han sugerido el papel de los AGS como fuente energética preferente del corazón. Además, ha sido demostrado que en circunstancias de bajo aporte de AGS en la dieta o dietas ricas en carbohidratos, el organismo sintetiza de novo, a partir de los carbohidratos, los AG que necesita, siendo el ácido palmítico (C16:0) el que se sintetiza en mayor medida. Este tipo de dietas provocan un aumento muy importante en el indicador de riesgo cardiovascular colesterol total/HDL-colesterol (Mensink y col., 2003) y un incremento en el contenido de TG en plasma (Dreon y col., 1999; Krauss y col., 2006), y disminución de concentraciones de HDL, con resultado final de resistencia a la insulina (Howard y col., 1998) y alteración del metabolismo de lipoproteínas (Berneis y Krauss, 2002).

6. Consideraciones finales

La complejidad de la estructura y la diversidad de funciones de los ácidos grasos sigue siendo poco conocida. Entre las conclusiones obtenidas después de más de 50 años de estudios epidemiológicos, figura que muchas de las enfermedades CVD relacionadas con la dieta son debidas a componentes multifactoriales, donde además del excesivo consumo en grasas saturadas, existen numerosos factores implicados, como el consumo de carbohidratos de elevado índice glicérico, ausencia de ejercicio, elevada presión arterial, homocisteína, proteína-C-reactiva, componente hereditario, estrés oxidativo, tabaquismo, obesidad y diabetes. Todos estos factores van a contribuir en mayor o menor medida a nuestra salud, dependiendo además de la predisposición genética del individuo particular. La genómica nutricional, nutrigenética

y nutrigenómica, que estudia la interacción entre los alimentos y sus componentes con el genoma de los individuos, será clave en el desarrollo de ingredientes o alimentos funcionales en el futuro.

Es importante reconocer que las grasas alimentarias y la grasa láctea en particular, desempeñan una función altamente conveniente y valiosa en nuestra dieta habitual, no solo por la estructura y palatabilidad que aportan a los alimentos, sino también desde el punto de vista nutricional y metabólico. Conviene además recordar la importancia de los múltiples compuestos bioactivos presentes en la fracción lipídica de la leche y por tanto indicar que estas propiedades no deben ser olvidadas en los intentos realizados por las industrias al desarrollar nuevos productos lácteos “nutricionalmente mejorados” basados en la eliminación y/o sustitución de la grasa láctea.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por diferentes proyectos de investigación: CYTED N° XI.24; ALIBIRD S-0505/AGR/000153 de la Comunidad de Madrid y CONSOLIDER Ingenio 2010 (FUN-C-FOOD):CSD 2007-00063.

Referencias

- Akahoshi, A., Koba, K., Ichinose, F., Kaneko, M., Shimoda, A., Nonaka, K., Yamasaki, M., Iwata, T., Yamauchi, Y., Tsutsumi, K., Sugano, M. (2004). Dietary protein modulates the effect of CLA on lipid metabolism in rats. *Lipids*. 39:25-30.
- Akalin, S., Gönç, S. y Ünal G. (2006). Functional Properties of Bioactive Components of Milk Fat in Metabolism. *Pakistan Journal of Nutrition*. 5: 194-197.
- Ascherio, A., Katan, MB., Zock, P.L., Stampfer, M.J., Willett, W.C. (1999). Trans fatty acids and coronary heart disease. *New England Journal Medicine*. 340:1994-8.
- Battacharaya, A., Banu, J., Rahman, M., Causey J., y Fernandes, G. (2006). Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *Journal of Nutrition and Biochemistry*. 17: 789-810.
- Belury, M.A. (2002). Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annual Reviews of Nutrition*. 22: 505-531.
- Berneis, K. K., & Krauss, R. M. (2002). Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *Journal of Lipid Research*. 43: 1363–1379.
- Chen, H., Born, E., Mathur, S.N., Johlin, F.C., Field, F.J. (1992). Sphingomyelin content of intestinal cell membranes regulates cholesterol absorption. Evidence for pancreatic and intestinal cell sphingomyelinase activity. *Biochemical Journal*. 286: 771-777
- Cheng, W.L., Lii, C.K., Chen, H.W., Lin, T.H., Liu, K.L. (2004). Contribution of conjugated linoleic acid to the suppression of inflammatory responses through the regulation of the NF-kappaB pathway. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 52:71-8.
- Christie, W.W. (1995). P.F. Fox (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry-2: Lipids*, Chapman and Hall, London. 1.-28.
- Clifton, P.M., Keogh, J.B., Noakes, M. (2004). Trans fatty acids in adipose tissue and the food supply are associated with myocardial infarction. *Journal of Nutrition*. 134:874-9
- Cooper, D. A. (2004) Carotenoids in health and disease: recent scientific evaluations, research recommendations and the consumer. *Journal of Nutrition*. 134: 221S-224S.
- Cooper, G.R., Myers, G.L., Smith, S.J. & Schlant, R.C. (1992). Blood lipid measurements-variations and practical utility. *Journal of the American Medical Association*, 267: 1652-1660.

- Coradini, D., Biffi, A., Costa, A., Pellizzaro, C., Pirronello, E., Di Fronzo, G. (1997) Effect of sodium butyrate on human breast cancer cell lines. *Cell Proliferation*. 30: 149-159.
- Dreon D.M., Fernstrom H.A., Williams P.T., Krauss R.M. (1999). A very-low-fat diet is not associated with improved lipoprotein profiles in men with a predominance of large, low-density lipoproteins. *American Journal of Clinical Nutrition*. 69: 411-418
- Eckhardt, M., Fewou, S.N., Ackermann, I. & Gieselmann, V. (2002) N-glycosylation is required for full enzymic activity of the murine galactosylceramide sulphotransferase. *Biochemical Journal*. 368: 317–324.
- FAO/WHO Joint FAO/WHO Expert Consultation. (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *World Health Organization*. Geneva, Switzerland. WHO technical report series 916: 3–108.
- Frede, E., Precht, D., Timmen, H. (1990). Lipide: Fettsäuren, Fette und Fettbegleitstoffe einschließlich fettlöslicher Vitamine. *Kompendium zur milchwirtschaftlichen Chemie*. 57-78.
- Fuente de la, M.A., Juárez, M. (2004). El ácido linoleico conjugado en la leche y los productos lácteos. *Alimentacion, nutricion y salud*. 11:101-113
- German, J.B.(1999).Butyric acid: a role in cancer prevention. *Nutrition Bulletin*. 24:293-9
- German, J.B., Dillard C.J. (2004).Saturated fats: what dietary intake?. *American Journal of Clinical Nutrition*. 80:550 –559.
- German J.B., Dillard, C.J. (2006). Composition, Structure and Absorption of Milk Lipids: A Source of Energy, Fat-Soluble Nutrients and Bioactive Molecules. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 46(1): 57-92.
- Glaser, K.R., Wenk, C., Scheeder, M.R. (2002). Effects of feeding pigs increasing levels of C 18:1 trans fatty acids on fatty acid composition of backfat and intramuscular fat as well as backfat firmness. *Archiv für Tierernährung*. 56:117-30.
- Gofman, J.W., Lindgren, F., Elliot, H., Mantz, W., Hewitt, J., Strisower, B. (1950). The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis. *Science*. 111:166–71.
- Ha, Y. L., Grimm, N. K., Pariza, M. W. (1987) Anticarcinogens from fried ground beef: heat altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*. 8: 1881-1887.
- Hannun, Y. A., Obeid, L. M. (2002). The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *Journal Biological Chemistry*. 277: 25487-25850.

- Hassig, C.A., Tong, J.K., Schreiber, S.L. (1997). Fiber-derived butyrate and the prevention of colon cancer. *Chemistry & Biology*. 4:783–789.
- He, K., Song, Y., Daviglus, M.L., Liu K., Van Horn, L., Dyer, A.R. (2004). Accumulated evidence on fish consumption and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of cohort studies. *Circulation*. 109:2705–11.
- Howard, C.J., Collins, R.A., Sopp, P., Brooke, G.P., Kwong, L.S., Parsons, K.R., Weynants, V., Letesson, J.J., Bembridge, G.P. (1998). T-cell responses and the influence of dendritic cells in cattle. *Adv. Veterinary Science*. 41: 275–288.
- IDF-International Dairy Federation (2005). Trans fatty acid: Scientific Progress and labelling. *Bulletin of International Dairy Federation* 393. Bruxelles. Belgium.
- IDF-International Dairy Federation (2007) The health benefits of milk and dairy products. *Bulletin International Dairy Federation*, 417. Bruxelles. Belgium.
- Ip, M. M., Masso-Welch, P. A., Ip, C. (2003). Prevention of mammary cancer with conjugated linoleic acid: role of stroma and the epithelium. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 8: 103-108.
- Jenkins, T.C. y McGuire, M. A. (2006). Major Advances in Nutrition: Impact on Milk Composition. *Journal of Dairy Science*. 89:1302–1310.
- Jensen, R.G. (2002). The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*, 85: 295-350.
- Kannel, W.B., Gordon, T. (1970). The Framingham Study: an epidemiological investigation of cardiovascular disease. *Washington (DC): US Government*.
- Kay, J.K., Mackle, T.R., Auldist, M.J., Thomson, N.A., Bauman, D.E. (2004). Endogenous synthesis of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in dairy cows fed fresh pasture. *Journal of Dairy Science*. 87:369-78.
- Keys, A., Anderson, J.T., Grande, F. (1957). Prediction of serum-cholesterol responses of man to changes in fats in the diet. *Lancet*. 273:959–66.
- Keys, A. (1980). Seven countries: A multivariate analysis of death and coronary heart disease. Cambridge, Mass: Harvard University Press. 1-381
- Khanal, R.C., Dhiman, T.R. (2004). Biosynthesis of conjugated linoleic acid (CLA): A review. *Pakistan Journal of Nutrition*. 3:72-81.
- Kivinen, A., Salminen, S., Homer, D., Vapaatalo, H. (1992). Gastroprotective effect of milk phospholipids, butter serum lipids and butter serum on ethanol and acetylsalicylic acid induced ulcers in rats. *Milchwissenschaft*. 47: 573-575.
- Kivinen, A., Tarpila, S., Salminen, S., Vapaatalo, H. (1992). Gastroprotection with milk phospholipids: a first human study. *Milchwissenschaft*. 47: 694-696.

- Kobayashi, T., Shimizugawa, T., Osakabe, T., Watanabe, S., Okuyama H. (1997). A long-term feeding of sphingolipids affected the level of plasma cholesterol and hepatic triacylglycerol but not tissue phospholipids and sphingolipids. *Nutrition Research*. 17: 111–4.
- Krauss, R.M., Blanche, P.J., Rawlings, R.S., Fernstrom, H.S. y Williams, P. T. (2006). Separate effects of reduced carbohydrate intake and weight loss on atherogenic dyslipidemia. *American Journal of Clinical Nutrition*. 83: 1025–1031.
- Kritchevsky, D. (1998). History of recommendations to the public about dietary fat. *Journal of Nutrition*. 128:449–52.
- Larsson, S.C., Bergkvist, L., Wolk, A. (2005). High-fat dairy food and conjugated linoleic acid intakes in relation to colorectal cancer incidence in the Swedish Mammography Cohort. *American Journal of Clinical Nutrition*. 82:894-900.
- Lecerf, J.M. (2008). Acides gras et maladies cardiovasculaires. *Sciences des Aliments*. 28:53-67.
- Legrand, P. (2008). Intérêt nutritionnel des principaux acides gras des lipides laitiers. *Sciences des Aliments*. 28:34-43.
- Lichtenstein, A.H., Erkkila, A.T., Lamarche, B., Schwab, U.S., Jalbert, S.M., Ausman, L.M. (2003). Influence of hydrogenated fat and butter on CVD risk factors: remnant-like particles, glucose and insulin, blood pressure and C-reactive protein. *Atherosclerosis*. 171:97-107.
- Luna, P., Fontecha, J., Juárez, M. A., y De la Fuente, M. A. (2005). Changes in the milk and cheese fat composition of ewes fed commercial supplements containing linseed with special reference to the CLA content and isomer composition. *Lipids*. 40: 445–454.
- Maier, S., Reich, E., Martin, R., Bachem, M., Altug, V., Hautman, R. E., Gschwend, J. E. (2000) Tributyrin induces differentiation, growth arrest and apoptosis in androgen-sensitive and androgen-resistant human prostate cancer cell lines. *International Journal of Cancer*. 88: 245-251.
- Maijala, K. (2000). Cow milk and human development and well-being. *Livestock Production Science*. 65: 1–18
- McGibbon y Taylor (2006). En: *Advanced Dairy Chemistry*, Vol. 2, Lipids, 3ª Ed, Fox, P.F. y McSweeney Eds, Springer: New York, pp.1-42.
- McCrae, C.H. (1999). Heat stability of milk emulsions: phospholipid–protein interactions. *International Dairy Journal*. 9: 227–231.

- McNamara, D.J. (2000). Dietary cholesterol and atherosclerosis. *Biochemica and Biophysica Acta*. 15529: 310-320.
- Meijer, G.W., van Tol, A., van Berkel, T.J., Weststrate, J.A. (2001). Effect of dietary elaidic versus vaccenic acid on blood and liver lipids in the hamster. *Atherosclerosis*, 157:31-40.
- Mensink, R.P., Katan, M.B. (1990). Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *New England Journal of Medicine*. 323:439-45.
- Mensink, R. P. (2005). Effects of stearic acid on plasma lipid and lipoproteins in humans. *Lipids*. 40: 1201–1205.
- Mensink, R. P., Zock, P. L., Kester, A. D. M., & Katan, M. B. (2003). Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: A meta-analysis of 60 controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition*. 77: 1146–1155.
- Menzel, T., Schaubert, J., Kreth, F., Kudlich, T., Melcher, R., Gostner, A. y Scheppach, W. (2002). Butyrate and aspirin in combination have an enhanced effect on apoptosis in human colorectal cancer cells. *European Journal of Cancer Prevention*. 11: 271-281.
- Merrill, B.J., Gat, U., DasGupta, R. y Fuchs, E. (2001). TCF3 and LEF1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin. *Genes Development*. 15:1688-1705
- Molkentin, J. (2000). Occurrence and biochemical characteristics of natural bioactive substances in bovine milk lipids. *British Journal of Nutrition*. 84:47-53
- Motouri, M. Matsuyama, H. Yamamura, J. Tanaka, M. Aoe, S. (2003). Milk Sphingomyelin Accelerates Enzymatic and Morphological Maturation of the Intestine in Artificially Reared Rats. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 36:241–247.
- Hilmarsson, H., Larusson, L.V. y Thormar, H. (2006) Virucidal effect of lipids on visna virus, a lentivirus related to HIV. *Archives of virology*. 151: 1217-1224.
- Ochoa, J.J., Farquharson, A.J., Grant, I., Moffat, L.E., Heys, S.D., Wahle, K.W. (2004). Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell proliferation: different molecular mechanisms for cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 isomers. *Carcinogenesis*. 25:1185-91.
- Pariza, M.W., Park, Y. y Cook, M.W. (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research*, 40: 283-298.

- Parodi, P.W. (2004). Milk fat in human nutrition. *Australian Journal of Dairy Technology*. 59: 3-59.
- Parodi, P.W. (2008). Milk lipids: their role as potential anti-cancer agents. *Sciences des Aliments*. 28:44-52.
- Pfeuffer, M. y Schrezenmeir, J. (2001). Dietary sphingolipids: Metabolism and potential health implications. *Bulletin IDF*. 363: 47-51.
- Ravnskov, U. (1999). The questionable role of saturated and polyunsaturated fatty acids in cardiovascular disease. *Journal of Clinical Epidemiology*. 51:443– 460.
- Riserus, U., Brismar, K., Arner, P., Vessby, B. (2002). Treatment with dietary trans- 10 cis- 12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 25:1516-1521.
- Saito, H., y Ishihara, K. (1997). Antioxidant activity and active sites of phospholipids as antioxidants. *Journal American Oil Chemistry Society*. 74:1531–1536.
- Santora, J., Palmquist, D., Rorhrig, K.L. (2000). Vaccenic acid is desaturated to conjugated linoleic acid in mice. *Journal of Nutrition*. 130:208-15.
- Schmelz, E.M. (2000). Dietary sphingomyelin and other sphingolipids in health and disease. *Nutrition Bulletin*. 25: 135–139
- Spiegel, S., Milstien, S. (2002). Sphingosine 1-phosphate: A key cell signaling molecule. *Journal of Biological Chemistry*. 277:25851–2584.
- Spitsberg, V.L. (2005). Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. *Journal of Dairy Science*. 88: 2289–2294.
- Steijns, J.M. (2008). Dairy products and health: Focus on their constituents or on the matrix?. *International Dairy Journal*. 18: 425–435.
- Sprong, R.E, Hulstein, M.F., Van der Meer, R. (1999). High intake of milk fat inhibits intestinal colonization of listeria but not of salmonella in rats. *Journal of Nutrition*. 129: 1382-1389.
- Thormar, H., Isaacs, E.E., Kim, K.S., Brown, H.R. (1994). Interaction of visna virus and other enveloped viruses by free fatty acids and monoglycerides. *Annals of New York Academy of Science*. 724:465-71.
- Tricon, S., Burdge, G.C., Kew, S., Banerjee, T., Russell, J.J., Jones, E.L., Grimble, R.F., Williams, C.M., Yaqoob, P., Calder, P.C. (2004). Opposing effects of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *American Journal of Clinical Nutrition*. 80:614-20.

- Tricon, S., Burdge, G. C., Williams, C., Calder, P., & Yaqoob, P. (2005). The effects of conjugated linoleic acid on human health-related outcomes. *Proceedings of the Nutrition Society*. 64: 171-182.
- Tricon, S., Burdge, G. C., Jones, E. L., Russell, J. J., El-Khazen, S., Moretti, E. (2006). Effects of dairy products naturally enriched with cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid on the blood lipid profile in healthy middle-aged men. *American Journal of Clinical Nutrition*. 83: 744-753.
- Turpeinen, A.M., Mutanen, M., Aro, A., Salminen, I., Basu, S., Palmquist, D.L., Griinari J.M. (2002). Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *American Journal Clinical Nutrition*. 76:504-10.
- Van Hooijdonk, A. C., Kussendrager, K. D., Steijns, J. M. (2000) In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence. *British Journal of Nutrition*. 84: S127-S134.
- Vesper, H., Schmelz, E.M., Nikolova-Karakashian, M.N., Dillehay, D.L., Lynch, D.V., Merrill, AH. (1999). Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *Journal of Nutrition*. 129: 1239-1250.

Actividad antibacteriana de los péptidos lácteos.

Iván López-Expósito, José Ángel Gómez-Ruiz, Wilman Carrillo, Isidra Recio
Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain.
Tel.: +34 91 5622900. fax: +34 91 5644853
E-mail: recio@ifi.csic.es

Resumen

Sin lugar a dudas, la leche es una excelente fuente de proteínas para el lactante y además de su importancia desde un punto de vista nutricional, las proteínas de la leche pueden ejercer un gran número de actividades fisiológicas. Entre estas actividades destacan la actividad inmunoestimulante, el incremento de la defensa frente a microorganismos patógenos, así como el desarrollo del tracto gastrointestinal. Además, en el interior de las proteínas se encuentran encriptados numerosos péptidos bioactivos que son susceptibles de ser liberados por diferentes procesos de hidrólisis. Se han identificado numerosas bioactividades en éstos péptidos, algunos de los cuales presentan más de un tipo de actividad biológica. Este capítulo se centra en los péptidos antimicrobianos más importantes derivados de proteínas lácteas y que podrían ser importantes para el lactante desde un punto de vista fisiológico. Se dedica especial atención a la generación de éstos péptidos por la acción de enzimas proteolíticas y al origen de éstas. El hecho que estas enzimas proteolíticas se encuentren en el tracto digestivo podría tener especial importancia a la hora que los péptidos ejerzan un papel en la defensa del organismo. También se tratan algunos péptidos presentes en la leche que, sin tener su origen en las proteínas lácteas, presentan actividad antimicrobiana. Finalmente, se describen los estudios *in vivo* más relevantes realizados con péptidos antimicrobianos.

1. Péptidos antimicrobianos

1.1. Péptidos derivados de proteínas lácteas

Las propiedades de la leche se conocen desde hace mucho tiempo. La incidencia de algunas enfermedades como infecciones respiratorias o diarrea es significativamente más baja en niños que toman el pecho que en aquellos alimentados con fórmulas infantiles. Existen diferentes factores responsables de este efecto protector. Pocos días después del parto, el papel más importante lo juega la actividad específica de las inmunoglobulinas (van Hooijdonk y col., 2000). También hay que tener en cuenta la presencia de diversas proteínas antimicrobianas inespecíficas que actúan en combinación con anticuerpos específicos. Entre estas proteínas destacan la lisozima, la lactoperoxidasa y la lactoferrina (Pakkanen y Aalto, 1997). Por último, hay que resaltar que en las proteínas de la leche (proteínas de suero y caseínas) se encuentran encriptados toda una batería de péptidos antimicrobianos que, liberados por la acción de diferentes enzimas, podrían actuar como parte activa de la inmunidad presente en el lactante. Aunque un gran número de péptidos antimicrobianos han sido descritos en los últimos años (Floris y col., 2003; López-Expósito y Recio, 2006a, b, c), este capítulo sólo abordará aquellos con posible actividad fisiológica.

1.1.1. Péptidos antimicrobianos derivados de caseínas

Las caseínas son proteínas tradicionalmente consideradas por su valor nutricional y sus propiedades en la modulación de calcio. Sin embargo, en los últimos veinte años se han descrito péptidos con diferentes propiedades bioactivas en su secuencia (Silva y Malcata, 2005). Entre ellos, se encuentran los péptidos antimicrobianos. Los fragmentos con propiedades antimicrobianas más relevantes así como su secuencia, origen y otras propiedades bioactivas se encuentran ilustrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Diferentes fragmentos de proteínas lácteas con actividad antimicrobiana. También se muestra su origen y otras actividades biológicas descritas en estos péptidos. Tabla tomada de López-Expósito y Recio (2008).

Fragmento ^{A, B}	Actividad antimicrobiana	Fuente	Otras actividades	Referencias
α_{s1} -caseína f(1-23)	Bacterias Gram ⁺ , hongos y levaduras. Estudios <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	Caseína bovina hidrolizada con quimosina	Immunomodulatoria	Lahov & Regelson, 1996
α_{s1} -caseína f(99-109)	Varias bacterias Gram + y Gram -	Caseinato sódico bovino hidrolizado con pepsina	-	Mc Cann y col., 2006
α_{s1} -caseína f(21-29)	Varias bacterias Gram + y Gram -	Caseinato sódico bovino fermentado con <i>Lactobacillus acidophilus</i> DPC6026	-	Hayes y col., 2006
α_{s2} -caseína f(164-169)	Varias bacterias Gram + y Gram -	α_{s2} -caseína bovina hidrolizada con pepsina	Promotor del crecimiento de bifidobacterias	Recio & Visser, 1999a
α_{s2} -caseína f(183-207)	Varias bacterias Gram + y Gram -	α_{s2} -caseína bovina hidrolizada con pepsina		Smith y col., 1997
α_{s2} -caseína f(165-170)	Varias bacterias Gram + y Gram -	α_{s2} -caseína ovina hidrolizada con pepsina	Antihipertensiva Antioxidante	López-Expósito y col., 2006b Recio y col., 2006
α_{s2} -caseína f(165-181)	Varias bacterias Gram + y Gram -	α_{s2} -caseína ovina hidrolizada con pepsina		
α_{s2} -caseína f(184-208)	Varias bacterias Gram + y Gram -	α_{s2} -caseína ovina hidrolizada con pepsina		
α_{s2} -caseína f(203-208)	Varias bacterias Gram + y Gram -	α_{s2} -caseína ovina hidrolizada con pepsina		
^H κ -caseína f(43-97)	Varias bacterias Gram + y Gram -, levaduras	Leche humana hidrolizada con pepsina	-	Liepke y col., 2001
κ -caseína f(106-169)	<i>S. mutans</i> <i>P. gingivalis</i> <i>E. coli</i>	Caseína bovina hidrolizada con quimosina	Promotor del crecimiento de bifidobacteria, Immunomodulatoria	Malkoski y col., 2001 Proulx y col., 1992 Brody, 2000
κ -caseína f(18-24)	Varias bacterias Gram + y Gram -	κ -caseína bovina hidrolizada con pepsina	-	López-Expósito y col., 2006c
κ -caseína f(30-32)	Varias bacterias Gram + y Gram -	κ -caseína bovina hidrolizada con pepsina	-	
κ -caseína f(139-146)	Varias bacterias Gram + y Gram -	κ -caseína bovina hidrolizada con pepsina	-	
^H β -caseína f(184-210)	Varias bacterias Gram + y Gram -	β -caseína humana hidrolizada con una proteinasa de <i>Lactobacillus helveticus</i> PR4	-	Minervini y col., 2003
LF f(17-41/42)	Varias bacterias Gram + y Gram -, virus, hongos, parásitos	LF bovina hidrolizada con pepsina o quimosina	Antitumoral Antiinflamatoria	Bellamy y col., 1992 Hoek y col., 1997 Iigo y col., 1999 Levay & Viljoen, 1995
^H LF f(1-47)	Varias bacterias Gram + y Gram -	LF humana hidrolizada con pepsina	-	Bellamy y col., 1992

Tabla 1. (continuación)

Fragmento ^{A, B}	Actividad antimicrobiana	Fuente	Otras actividades	Referencias
LF f(1-48)	<i>Micrococcus flavus</i>	LF bovina hidrolizada con pepsina	-	Recio & Visser, 1999b
LF f(1-47)				
LF f(277-288)				
LF f(267-285)				
LF f(267-288)				
^C LF f(14-42)	<i>Micrococcus flavus</i>	LF caprina hidrolizada con pepsina	-	Recio & Visser, 2000
α -Lac f(1-5)	<i>Escherichia coli</i>	LF caprina hidrolizada con pepsina	-	Recio & Visser, 2000
α -Lac f(17-31)S-S(109-114)				
α -Lac f(61-68)S-S(75-80)	Varias bacterias Gram +	α -Lac bovina hidrolizada con quimotripsina	-	Pellegrini y col., 1999
β -Lg f(15-20)	Varias bacterias Gram +	β -Lg bovina hidrolizada con tripsina	-	Pellegrini y col., 2001
β -Lg f(25-40)				
β -Lg f(78-83)				
β -Lg f(92-100)				

^A No se incluyen aquellos péptidos obtenidos por síntesis química
^B Si no se indica lo contrario, todas las proteínas son bovinas
El superíndice se refiere al origen de la proteína precursora: ^O, ovino, ^H, humano y ^C, caprino.
LF, lactoferrina; β -Lg, β -lactoglobulina; α -Lac, α -lactalbumina.

Al primer péptido con actividad antimicrobiana identificado en la secuencia de la α_{s1} -caseína se le llamó isradicina (Hill y col., 1974). Se obtuvo mediante la digestión con quimosina de caseína bovina y corresponde al fragmento N-terminal de la α_{s1} -caseína f(1-23). Este péptido inhibe el crecimiento de lactobacilos *in vitro* y de una gran variedad de bacterias Gram-positivas aunque únicamente a elevadas concentraciones. McCann y col. (2006) aislaron el fragmento correspondiente a los residuos 99-109 de la α_{s1} -caseína bovina. Este péptido se obtuvo a través de la hidrólisis de caseinato de sodio bovino con pepsina. El fragmento mostró un amplio espectro de actividad frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Debido a que este fragmento procede de la digestión de caseína bovina con pepsina, es posible que se pueda formar en el estómago y contribuya a la protección frente a la infección por microorganismos en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, son necesarios estudios *in vivo* que confirmen esta hipótesis. En el mismo año, Hayes y col. (2006) obtuvieron por fermentación de caseinato sódico bovino con *Lactobacillus acidophilus* DPC6026 dos potentes fragmentos derivados de α_{s1} -caseína correspondientes a los fragmentos f(21-29) y f(30-38). Ambos péptidos mostraron una potente actividad frente a *Enterobacter sakazakii*, microorganismo que puede estar presente en fórmulas infantiles y ser responsable de meningitis en neonatos (Nazarowec-White y Farber, 1997).

Uno de los péptidos derivado de las caseínas que ha recibido especial atención es el fragmento f(183-207) de la α_{s2} -caseína bovina. Este péptido fue identificado de manera conjunta con el fragmento f(164-179) en un hidrolizado de la proteína con pepsina (Recio y Visser, 1999a). Ambos fragmentos mostraron potente actividad frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas con valores de MIC variables entre 8-16 μM en el caso del fragmento f(183-207). Recientemente, López-Expósito y col. (2008a) han demostrado el efecto sinérgico entre el f(183-207) y la lactoferrina frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, y *Listeria monocytogenes*. Si este

péptido se generase tras hidrólisis enzimática en el tracto gastrointestinal del lactante ambos compuestos podrían coexistir en el mismo, y de este modo tener un destacado papel fisiológico en la defensa frente a microorganismos. Las primeras aproximaciones al mecanismo de acción del fragmento f(183-207) de la α_{s2} -caseína bovina se han publicado recientemente (López-Expósito y col., 2008b). Los resultados mostraron que los sitios iniciales de unión del péptido son el ácido lipoteicoico en las bacterias Gram-positivas y el lipopolisacárido en las Gram-negativas. El péptido es capaz de permeabilizar las membranas interna y externa además de generar poros en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y en la pared bacteriana de las Gram-positivas.

La búsqueda de actividad antimicrobiana dentro de la secuencia de la α_{s2} -caseína se ha extendido a otras especies animales. Se han identificado cuatro péptidos con actividad antibacteriana en un hidrolizado de α_{s2} -caseína ovina con pepsina (López-Expósito y col., 2006b). Los péptidos correspondían a los fragmentos α_{s2} -caseína f(165-170), f(165-181), f(184-208), y f(203-208). Los péptidos de origen ovino identificados mostraron menor actividad antibacteriana que los bovinos frente a bacterias Gram-negativas. En el caso de las bacterias Gram-positivas, todos los péptidos identificados mostraron una potente actividad con ciclos logarítmicos de reducción comprendidos entre 1.1 y 6.0. Uno de los péptidos identificados en este hidrolizado, α_{s2} -caseína f(203-208), es un excelente ejemplo de péptido multifuncional ya que además de actividad antimicrobiana posee potente actividad antihipertensiva y antioxidante (López-Expósito y col., 2007).

La molécula de κ -caseína es también precursora de algunos péptidos antimicrobianos. Liepke y col., (2001) identificaron una secuencia con actividad antimicrobiana correspondiente al fragmento no glicosilado f(63-117) de la κ -caseína humana, el cual se obtuvo tras la acidificación de la leche humana e incubación con pepsina durante 2

h a 37°C. El espectro de acción del fragmento f(63-117) sintetizado químicamente incluye la inhibición de bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y levaduras. Estos resultados podrían ser relevantes desde el punto de vista fisiológico ya que apoyarían la hipótesis de que los péptidos antimicrobianos se generan a partir de la leche humana durante la digestión del lactante y, de ese modo juegan un papel muy importante en el sistema defensivo del recién nacido. La kappacina (Malkoski y col., 2001) es otro ejemplo de péptido antibacteriano derivado de la κ -caseína. La kappacina es la forma no glicosilada y fosforilada del CMP [κ -caseína (106-169)]. Para caracterizar la región activa de la kappacina, el péptido se hidrolizó con endoproteinasa Glu-C, observándose que el péptido Ser (P)¹⁴⁹ κ -caseína A f(138-158) era la forma activa con actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas gingivalis*. Es muy importante destacar que la forma activa corresponde al péptido no-glicosilado y fosforilado, ya que está demostrado que las formas glicosiladas y no fosforiladas no tienen actividad frente a *Streptococcus mutans*. Los estudios de modelización molecular y predicciones de estructura secundaria de la kappacina han indicado que el péptido dispone de residuos que podrían formar una α -hélice anfipática, y agregarse para formar un poro aniónico, de modo que se incremente la permeabilidad de la membrana a los cationes. Dashper y col., (2005) han observado que a pH 6,5, la kappacina es capaz de aumentar la permeabilidad de los liposomas, por lo que se propuso un modo de acción membranólítico, de manera que el péptido se agregaría para formar un poro aniónico. La fosforilación, que como se comentó previamente es esencial para la actividad, parece que es la responsable de un cambio de conformación en el péptido a través de repulsiones electroestáticas o bien por unión con iones divalentes que le permite interactuar con la membrana bacteriana. El CMP se ha detectado en estómago, duodeno y yeyuno de humanos tras la ingestión de leche (Ledoux y col., 1999). La

formación de la kappacina en el estómago podría ser por tanto un mecanismo que limitaría la infección en el tracto gastrointestinal del neonato. Otros péptidos antibacterianos destacados por su importancia fisiológica al haber sido obtenidos con una enzima gástrica son aquellos identificados por López-Expósito y col. (2006c). Los fragmentos de κ -caseína más activos obtenidos por hidrólisis con pepsina fueron los fragmentos f(18-24), f(139-146) y f(30-32).

A pesar que la β -caseína es una de las proteínas más abundantes en la leche humana (35% del total de caseínas) (Fox, 2003), hay muy pocos estudios centrados en la búsqueda de péptidos antibacterianos en esta proteína. Uno de estos estudios realizados por Gómez-Ruiz y col., (2005) demostró que un hidrolizado de β -caseína ovina con enzimas gastrointestinales era capaz de inhibir la actividad metabólica de *Escherichia coli*. Sin embargo, no se identificaron los péptidos responsables de esta actividad. Por otro lado, a partir de leche humana hidrolizada con una proteinasa purificada de *Lactobacillus helveticus* PR4 se ha identificado un péptido de la β -caseína con actividad antimicrobiana (Minervini y col., 2003). Este péptido corresponde al fragmento de β -caseína humana f(184-210) y mostró un amplio espectro frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas incluyendo algunas de interés clínico. Además, los autores demostraron que el péptido es resistente a la degradación por tripsina y quimotripsina.

1.1.2. Péptidos antimicrobianos derivados de proteínas de suero

Sin lugar a dudas, los péptidos derivados de la lactoferrina son los péptidos antimicrobianos que han sido más ampliamente estudiados durante los últimos 10 años (ver las revisiones bibliográficas de Wakabayashi y col., 2003, 2006 y Jensen y Handcock, 2009). En 1992 Bellamy y col. estudiaron la presencia de péptidos antimicrobianos en lactoferrina humana y bovina. Estos investigadores encontraron un dominio antimicrobiano en la región N-terminal de ambas lactoferrinas. Ambos

péptidos se obtuvieron a partir de la hidrólisis de lactoferrina con pepsina y demostraron mayor actividad antimicrobiana que la proteína precursora. En el caso de la lactoferrina humana el péptido correspondía al fragmento f(1-47) y se denominó lactoferricina humana, mientras que en la lactoferrina bovina se identificó el fragmento f(17-41) como el responsable de la actividad (conocido como lactoferricina bovina). Además, las dos lactoferricinas no actuaban siguiendo el mecanismo de acción descrito para la lactoferrina que se basa en su capacidad para secuestrar hierro.

La lactoferricina se ha revelado como un péptido antimicrobiano con un amplio espectro de actividades frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Bellamy y col., 1992), hongos (Muñoz y Marcos, 2006) y parásitos (León-Sicario y col., 2006). Además, también se presenta actividad antiviral (Pietrantoni y col., 2006), antitumoral (Iigo y col., 1999) y antiinflamatoria (Levay y Viljoen, 1995).

La hidrólisis de lactoferrina con pepsina provoca no sólo la liberación de lactoferricina y fragmentos que contienen lactoferricina, sino también de otros péptidos catiónicos. Estos fragmentos corresponden a lactoferrina f(277-288), lactoferrina f(267-285) y lactoferrina f(267-288) (Recio y Visser, 1999b). Un péptido, f(268-284), englobado en uno de estos fragmentos de lactoferrina y conocido como lactoferrampina ha sido sintetizado observándose que presentaba actividad frente a *Candida* así como frente a *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (van der Kraan y col., 2004). Además de pepsina porcina, se ha comprobado que la hidrólisis con otras enzimas como la quimosina da lugar a la formación de fragmentos análogos a la lactoferricina (Hoek y col., 1997). Recientemente, Haney y col., (2009) sintetizaron lactoferrampina humana [f(269-285)] además del mismo péptido con diferentes aminoácidos en los extremos N- y C-terminal. Estos investigadores observaron que un aumento de la carga neta positiva del extremo C-terminal del péptido incrementaba significativamente su actividad antimicrobiana y su actividad frente a *Candida albicans*. Además de la lactoferrina humana y bovina, se ha empleado lactoferrina de diversos

orígenes para obtener péptidos antimicrobianos. De esta manera, se ha sintetizado el fragmento f(17-41) de la lactoferrina de cabra y roedores y se ha observado que, aunque en menor extensión que la bovina, presenta actividad antibacteriana (Vorland y col., 1998). También se ha detectado actividad antimicrobiana en hidrolizados de lactoferrina de cabra con pepsina identificándose el fragmento f(14-42), homólogo a la lactoferricina. Al comparar la lactoferricina bovina con la caprina se vio que ésta última exhibe menor actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y que ambas presentan similar actividad frente a *Micrococcus flavus* (Recio y Visser, 2000). Recientemente se ha sintetizado un fragmento de la lactoferrina porcina f(17-41) el cual presenta actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Este fragmento, conocido como lactoferricina porcina, es cuatro veces más activo que la lactoferricina humana aunque ligeramente menos efectivo que la lactoferricina bovina (Chen y col., 2006a).

La estructura de la lactoferricina y de otros péptidos derivados de la lactoferrina como la lactoferrampina es similar a la de otros péptidos catiónicos. Estos péptidos se caracterizan por presentar un gran número de residuos con carga positiva así como una región hidrofóbica con presencia de triptófano que está implicado en la inserción en la membrana bacteriana (Schiffer y col., 1992). Hoy en día se acepta que el mecanismo por el cual la mayoría de los péptidos catiónicos ejercen su acción es la disrupción de la membrana citoplasmática bacteriana (Zasloff, 2002). Sin embargo, algunos péptidos antibacterianos podrían tener ciertas dianas en el citoplasma bacteriano. El modo de acción de la lactoferricina y sus análogos se ha estudiado extensamente. En primer lugar, la lactoferricina se une a la membrana bacteriana cargada negativamente a través de interacciones electrostáticas (Bellamy y col, 1993). El sitio de unión con las Gram-positivas es la capa de ácido teicoico mientras que en el caso de las Gram-negativas la interacción se produce con los polisacáridos de la membrana externa. Una vez unida a la bacteria, la lactoferricina no provoca su lisis

sino que es capaz de atravesar la membrana citoplasmática y alcanzar el citoplasma. Una vez en el citoplasma se sabe que la lactoferricina inhibe la maquinaria bacteriana implicada en la síntesis proteica, aunque no se sabe con certeza el mecanismo de inhibición (Ulvatne y col., 2004).

En la última década ha aumentado el interés por profundizar más en el estudio de la relación entre la estructura y la actividad de la lactoferricina (Strøm y col. 2002; Vogel y col., 2002). Mediante el uso de microcalorimetría y espectroscopia de fluorescencia con modelos de membranas se ha visto que la lactoferricina tiene preferencia para interaccionar con las membranas bacterianas y con las membranas de células cancerígenas cargadas negativamente, en lugar de las membranas neutras de las células eucariotas. Además, mientras que la actividad antimicrobiana, antifúngica, antitumoral y antivírica está relacionada con la proporción de triptófano/arginina presente en el péptido, las propiedades antiinflamatorias e inmunomodulantes están más relacionadas con la región cargada positivamente (Vogel y col., 2002).

La lactoferricina podría tener un papel importante desde un punto de vista fisiológico. Cuando la lactoferrina se administra oralmente es parcialmente degradada en ciertos fragmentos algunos de los cuales contienen la secuencia de la lactoferricina (Kuwata y col., 1998a). Más tarde Kuwata y col. (1998b) demostraron que estos fragmentos sobreviven el tránsito a través del tracto gastrointestinal aunque no han sido detectados en sangre (Wakabayashi y col., 2004). Recientemente, se ha demostrado que la lactoferrina bovina y la lactoferricina derivada de su hidrólisis actúan de manera sinérgica frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus epidermidis*. Se cree que este efecto sinérgico podría incrementar las defensas frente a microorganismos invasores (López-Expósito y col., 2008a).

Otra de las proteínas antimicrobianas más estudiadas junto con la lactoferrina es la lisozima. Debido a su alta presencia en la clara de huevo de gallina (1-3 g/L) la mayor parte de los estudios se realizan utilizando lisozima con este origen. Varias revisiones

bibliográficas se han publicado en los últimos años (Ibrahim, 2003; Pellegrini, 2003; Masschalck y Michiels, 2003; Mine y col., 2004). Pellegrini y col., (1997) sintetizaron el dominio de la doble hélice que contiene el fragmento f(98-112). Este fragmento, el cual presenta actividad antimicrobiana, se obtiene a partir de la hidrólisis de lisozima. En el caso de la lisozima humana, el dominio homólogo es el fragmento f(87-115) al cual se le ha descrito actividad microbica frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas así como frente a *Candida albicans* (Ibrahim y col., 2001).

La hidrólisis de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina con tripsina o quimiotripsina da lugar a la formación de diferentes polipéptidos con moderada actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas (Pellegrini y col., 1999, 2001). Se ha analizado la actividad antimicrobiana de proteínas de suero de oveja y de sus hidrolizados con pepsina frente a diferentes bacterias patógenas. Aunque no se llevó a cabo la identificación de ningún péptido, El-Zahar y col., (2004) observaron que el hidrolizado con pepsina era capaz de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* HB101, *Escherichia coli* Cip812, *Bacillus subtilis* Cip5265 y *Staphylococcus aureus*. Recientemente también se han realizado diversos estudios con proteínas de suero de cabra. Las proteínas de suero fueron hidrolizadas de dos maneras diferentes y la actividad antimicrobiana comparada. En uno de los tratamientos las proteínas de suero fueron hidrolizadas con jugo gástrico humano (pH 2.5) y posteriormente con jugo duodenal humano (pH 7.5). En el otro tratamiento las proteínas de suero fueron hidrolizadas con pepsina, tripsina y quimiotripsina. Ambos tratamientos dieron lugar a diferentes perfiles peptídicos y a diferentes actividades antimicrobianas. Los hidrolizados obtenidos con el tratamiento conjunto con los jugos gástrico y duodenal humanos fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*. Sin embargo, mientras que el hidrolizado producido en el jugo gástrico fue activo frente a *Bacillus cereus* la actividad desapareció después del tratamiento con el jugo duodenal (Almaas y col., 2006).

1.2. Defensinas y catelicidinas

Además de las secuencias peptídicas producidas enzimáticamente, existen otros péptidos en la leche con propiedades relacionadas con la defensa del lactante que son expresados de forma activa por la glándula mamaria. Hasta ahora únicamente se han identificados dos categorías de estos péptidos antimicrobianos en leche humana: catelicidinas y defensinas. Las catelicidinas y defensinas presentes en la leche humana junto con sus concentraciones y principales actividades biológicas se encuentran resumidas en la Tabla 2.

1.2.1. Catelicidinas

Las catelicidinas se sintetizan como precursores peptídicos de secuencia larga con una secuencia señal N-terminal conservada (pro-péptido), seguida por una región antimicrobiana C-terminal variable. La heterogeneidad en la región C-terminal variable que codifica el péptido maduro puede tener entre 12-80 aminoácidos, generándose péptidos con diferente potencial bactericida (Dommet y col., 2005).

En la leche humana, sólo se ha identificado la catelicidina LL37. Este péptido, generado a partir de la proteólisis del fragmento C-terminal de otra proteína precursora (hCAP18), se encuentra en la leche humana en concentraciones de hasta 32 μM (Murakami y col., 2005). A esta concentración, estudios con LL37 sintético han demostrado su actividad frente a un amplio rango de microorganismos (Turner y col., 1998). La actividad antimicrobiana *in vivo* de la catelicidina LL37 podría estar aumentada por la presencia de otras sustancias que actuarían de manera sinérgica con ella como sIgA, lactoferrina, lisozima, ácidos grasos o glicanos (Newburg, 2005; Isaacs, 2005). Además de su actividad antimicrobiana, el péptido LL37 se une y neutraliza el lipopolisacárido y protege frente al shock endotóxico en un modelo murino

Tabla 2. Catelicidinas y defensinas presentes en leche humana, concentraciones y actividades biológicas. Tabla tomada de López-Exposito y Recio (2008).

Péptido	Rango de concentraciones	Actividad biológica	Referencias
Catelicidina humana (LL37)	0-160.65 µg/mL	Antimicrobiana Antitumoral Inmunomodulante Re-epitelización	Murakami y col., 2005 Okamura y col., 2004 Bals y col., 1999 Zanetti y col., 2004
β-defensin 1 humana (hBD1)	0-23 µg/mL	Antimicrobiana Inmunomodulante	Armogida y col., 2004 Jia y col., 2001 Yang y col., 1999
β-defensin 2 humana (hBD2)	8.5-56 µg/mL	Antimicrobiana	Armogida y col., 2004 Lehrer y Ganz, 2002
α-defensina 5 humana (hD5) α-defensina 6 humana (hD6)	0-11.8 µg/mL	Antimicrobiana	Armogida y col., 2004 Porter y col., 1997
α-peptido derivado de neutrófilos humanos (hNP1-3)	5-43.5 µg/mL	Antimicrobiana	Armogida y col., 2004 Ganz y Weiss 1997 Harder y col., 1997

de septicemia (Bals y col., 1999). Asimismo, tiene propiedades inmunomodulantes y antitumorales (Zanetti, 2004; Okumura y col., 2004).

1.2.2. Defensinas

Las defensinas son un grupo de péptidos con secuencias de entre 29-45 residuos aminoacídicos con propiedades antimicrobianas y citotóxicas. Hasta ahora se han identificado varias defensinas bien en leche humana o en tejido mamario (en el rango de $\mu\text{g/mL}$): β -defensina humana-1 (hBD-1), β -defensina humana-2 (hBD-2), α -péptido derivado de neutrófilos humanos (hNP1-3), α -defensina humana-5 (hD-5) y α -defensina humana-6 (hD-6) (Armogida y col., 2004).

hBD-1 se encuentra presente tanto en el epitelio de la glándula mamaria (Tunzi y col., 2000) como en la leche humana en concentraciones desde 1 hasta 10 $\mu\text{g/mL}$ (Jia y col., 2001). Se ha demostrado que las concentraciones urinarias de hBD-1 son mayores en mujeres embarazadas que en otros sujetos sugiriendo que los cambios hormonales durante el embarazo podrían regular la expresión de hBD-1 (Valore y col., 1998). La producción y secreción de hBD-1 por el epitelio de la glándula mamaria podría aumentar durante el periodo de lactación, ofreciendo un nuevo ejemplo de los beneficios de la lactancia materna. Además de su efecto microbicida directo, hBD-1 impacta en la inmunidad neonatal a través de efectos inmunomodulantes (Yang y col., 1999). El péptido hBD-1 en la leche materna podría promover la activación de la respuesta inmune adaptativa en la nasofaringe y tracto gastrointestinal del neonato reclutando células dendríticas y linfocitos-T en esos tejidos mucosos.

El péptido hBD-2 se ha detectado en leche humana en concentraciones que varían desde 8.5 a 56 $\mu\text{g/mL}$ (Armogida y col., 2004), aunque otros estudios no han tenido éxito en la detección de transcritos de hBD-2 (Tunzi y col., 2000; Jia y col., 2001; Murakami y col., 2005). Estos resultados contradictorios podrían deberse a la inestabilidad del péptido hBD-2. Además, es muy posible que la expresión de estos

péptidos en el tejido mamario suceda a nivel constitutivo e inducible. El fragmento hBD-2 tiene una potente actividad frente a bacterias Gram-negativas y frente a *Candida* (Lehrer y Ganz, 2002), y su expresión puede aumentar durante los procesos infecciosos e inflamatorios.

hNP1-3 se ha identificado en leche humana en concentraciones variables desde 5-43.5 µg/mL (Armogida y col., 2004). Esta α-defensina ha mostrado tener actividad frente a *Candida albicans* con dosis letales 50 (LD₅₀) de 2.2 µg/mL, y frente a *Escherichia coli* y *Streptococcus faecalis* con un valor de LD₅₀ ≥ 10 µg/mL (Ganz y Weiss, 1997; Harder y col., 1997).

Las concentraciones de HD-5 y HD-6 en leche humana se encuentran entre 0-11.8 µg/mL (Armogida y col., 2004). Aunque ambas defensinas se encuentran en menor concentración que HNP1-3 y hBD-2 son de importancia crítica en el tracto gastrointestinal del neonato. Niveles bajos de estas defensinas se relacionan con un aumento en el riesgo de colitis necrotizante, un serio desorden gastrointestinal de etiología desconocida en niños prematuros (Salzmann y col., 1998). Es importante destacar que las concentraciones de HD-5 y HD-6 son significativamente mayores en el calostro que en la leche madura.

El mecanismo preciso mediante el cual las defensinas ejercen su actividad antimicrobiana no está definido claramente aunque se ha propuesto que las defensinas son capaces de permeabilizar las membranas mediante la formación de poros multiméricos. Se ha sugerido que las características catiónicas y anfipáticas de este tipo de péptidos antimicrobianos favorecerían la unión e interacción directa con los lípidos de la bicapa provocando la liberación de los contenidos acuosos de la célula (Chen y col., 2006).

2. Estudios *in vivo* sobre péptidos antibacterianos derivados de la leche

En los últimos años se han realizado estudios *in vivo* sobre el papel de diversos péptidos (defensinas y catelicidinas) en la defensa del organismo (Bowdish y col., 2005; Brodgen y col., 2004). Los estudios en animales muestran que estos péptidos son clave en la prevención y curación de diversas infecciones. En los mamíferos, estos péptidos tienen en muchos casos un efecto principalmente inmunomodulante. Actualmente, son necesarios nuevos modelos *in vivo* que expliquen mejor como estos péptidos pueden actuar en la defensa del organismo. A la hora de examinar la posible actividad microbicida o inmunoregulatoria de estos péptidos se tienen que considerar dos factores principalmente: por un lado el entorno en el cual estas actividades son evaluadas y por otro las concentraciones a las que los péptidos se encuentran *in vivo*. Por otro lado, hasta la fecha, sólo se han realizado unos pocos estudios usando animales modelos o en pruebas clínicas en humanos sobre la actividad antimicrobiana *in vivo* de péptidos derivados de proteínas lácteas. Algunos de estos estudios en animales modelo muestran que la administración oral de lactoferricina protege frente a la infecciones de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina (Nakasone y col., 1994) y del parásito *Toxoplasma gondii* (Isamida y col., 1998). La mayoría de estos estudios se han realizado para demostrar la actividad antimicrobiana de la proteína lactoferrina cuando se administra oralmente. Sin embargo, debido a que al administrar lactoferrina oralmente ésta es degradada parcialmente a fragmentos que contienen la secuencia de la lactoferricina (Kuwata y col., 1998a, b), algunos de los efectos que han sido demostrados para la lactoferrina pueden ser probablemente atribuidos a fragmentos de la lactoferrina o a una acción combinada de la lactoferrina y péptidos derivados de su hidrólisis. Entre otros efectos se ha visto que la lactoferrina es capaz de suprimir el crecimiento y la translocación de enterobacterias en el intestino de ratones (Teraguchi y col., 1994; 1995). También se ha observado que la administración oral de lactoferrina protege frente a la infecciones de *Staphylococcus*

aureus resistentes a meticilina y *Candida albicans* (Bhimani y col., 1999). Lee y col., (2005) demostraron que la lactoferrina humana disminuye la colonización hepática de *Listeria monocytogenes*, la necrosis hepática, y la expresión de citoquinas inflamatorias en ratones infectados oralmente con *Listeria monocytogenes*. Recientemente, Ochoa y Cleary, (2009) han publicado una revisión bibliográfica del efecto de la lactoferrina sobre patógenos entéricos.

Un estudio realizado con recién nacidos con bajo peso mostró que el consumo de fórmulas infantiles enriquecidas con lactoferrina contribuye a la formación de una flora rica en bifidobacterias (Kawaguchi y col., 1989). Di Mario y col., (2003) demostraron que la lactoferrina es muy efectiva en la eliminación de *Helicobacter pylori* cuando se usa como suplemento a un tratamiento con antibióticos. Diferentes autores han revisado varios estudios *in vivo* sobre el efecto antiviral e inmunomodulatorio de la lactoferrina, la prevención del cáncer así como diferentes aplicaciones clínicas de esta proteína (Tomita y col., 2002; 2009; Marshall 2004; Iigo y col., 2009).

Existen varios estudios *in vivo* sobre la actividad de la isracidina. En ratones, se ha visto que la isracidina es capaz de proteger frente a *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*. De la misma manera, la isracidina ofrece protección frente a *Staphylococcus aureus* en conejos, cobayas y ovejas. En vacas que presentan mastitis, la isracidina es eficaz en el 80 % de los casos en el tratamiento de infecciones crónicas de estreptococos. Además, también se ha demostrado que la isracidina posee propiedades inmunomodulantes. Este péptido cuando es inyectado en ratones provoca un aumento significativo en la producción de IgG, IgM, en la formación de células generadoras de anticuerpos e incrementa la inmunidad mediada por células (Lahov y Regelson, 1996).

Hidrolizados tripticos de caseína han mostrado una eficacia profiláctica y terapéutica comparable a Fermosob, una preparación antimicrobiana de uso veterinario en el control de la colibacilosis (Biziulevicius y Zukaite, 1999, Biziulevicius y col., 2003). Este

hidrolizado mostró una eficacia del 93.0 % desde el punto de vista terapéutico y un 93.5 % desde el punto de vista profiláctico no sólo a nivel antimicrobiano sino también como preparado inmunoestimulante. Sin embargo, en este estudio no se identificaron los péptidos responsables de esta actividad.

Recientemente, un producto obtenido a partir de calostro de vaca rico en inmunoglobulinas, factores de crecimiento, péptidos antimicrobianos y nutrientes redujo el número de deposiciones/día en pacientes que presentaban diarrea asociada al síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Además de este efecto beneficioso, los niveles de hemoglobina y albúmina se incrementaron en estos pacientes, sus síntomas de fatiga disminuyeron y su peso corporal aumentó. Todos estos efectos se vieron acompañados por un incremento en el número de CD4⁺ (Floren y col., 2006).

Conclusiones

Al ser amamantado, el recién nacido adquiere protección frente a infecciones de tipo bacteriano y viral. Además, la madre también obtiene protección frente a posibles infecciones mamarias y desarrollo de mastitis.

Aparte de otros componentes, la leche posee una amplia variedad de proteínas que proporcionan un gran número de actividades biológicas como actividad antimicrobiana o actividad inmunoestimulante. Al mismo tiempo, existen una serie de péptidos que se forman durante la digestión que pueden inhibir el crecimiento de bacterias y virus y, por tanto, protegernos frente a infecciones. Otros péptidos son secretados hacia la leche directamente en una forma activa como las defensinas y las catelicidinas. Estos péptidos han demostrado su capacidad para proteger de la colonización bacteriana la superficie del epitelio pulmonar, intestinal o la piel. Además, hay que subrayar que las proteínas de la leche proporcionan una cantidad adecuada de aminoácidos esenciales al niño que está creciendo.

Actualmente existe un creciente interés por parte de la industria en la aplicación de péptidos y proteínas a los alimentos funcionales con el objetivo de contribuir al bienestar humano y de los animales. Hoy en día es posible producir péptidos y proteínas con actividad biológica a gran escala con muy bajo coste, bien sea mediante técnicas recombinantes o, en el caso de los péptidos, por hidrólisis enzimática o fermentación bacteriana. Estos péptidos y proteínas podrían ser usados de manera segura para la alimentación humana y animal.

Referencias

- Almaas, H., Holm, H., Langrud, T., Flengsrud, R. & Vegarud, G.E. (2006). In vitro studies of the digestion of caprine whey proteins by human gastric and duodenal juice and the effects on selected microorganisms. *British Journal of Nutrition*, 96, 562-569.
- Armogida, S.A., Yannaras, N.M., Melton, A.L. & Srivastava, M. (2004). Identification and quantification of innate immune system mediators in human breast milk. *Allergy and Asthma Proceedings*, 25, 297-304.
- Bals, R., Weiner, D. J., Moscioni, A. D., Meegalla, R.L. & Wilson, J.M. (1999). Augmentation of innate host defense by expresión of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infection and Immunity*, 67, 6084-6089.
- Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., & Tomita, M. (1992). Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1121, 130-136.
- Bellamy, W., Wakabayashi, H., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S., & Tomita, M. (1993). Killing of *Candida albicans* by lactoferricin-B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Medical Microbiology and Immunology*, 182, 97-105.
- Bhimani, R. S., Vendrov, Y., & Furmanski, P. (1999). Influence of lactoferrin feeding and injection against systemic staphylococcal infections in mice. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 135-144.
- Biziulevicius, G. A. & Zukaite, V. (1999). Lysosubtilin modification, Ferosob, designed for polymeric carrier-mediated intestinal delivery of lytic enzymes: pilot-scale preparation and evaluation of this veterinary medicinal product. *International Journal of Pharmacology*, 189, 43-55.
- Biziulevicius, G. A., Zukaite, V., Normatiene, T., Biziuleviciene, G. & Arestov, I. (2003). Non-specific immunity-enhancing effects of tryptic casein hydrolysate versus Ferosob for treatment/prophylaxis of newborn calf colibacillosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 39, 155-161.
- Bowdish, D. M. E., Davidson, D. J. & Hancock, R.E.W. (2005). A Re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. *Current Protein and Peptide Science*, 6, 35-51.
- Brody, E. P. (2000). Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition*, 84, S39-S46.

- Brogden, K. A., Ackermann, M., Zabner, J. & Welsh, M. J. (2004). Antimicrobial peptides suppress microbial infection and sepsis in animal models. In R.E.W. Hancock & D. Devine (Eds), *Mammalian host defence peptides* (pp. 189-229). New York: Cambridge University press.
- Chen, H., Xu, Z., Peng, L., Fang, X., Yin, X., Xu, N. & Cen, P. (2006b). Recent advances in the research and development of human defensins. *Peptides*, 27, 931-940.
- Chen, H. L., Yeng, C. C., Lu, C. Y., Yu, C. H. & Chen, C. M. (2006a). Synthetic porcine lactoferricin with a 20-residue peptide exhibits antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3277-3282.
- Dashper, S. G., O'Brien-Simpson, N. M., Cross, K. J., Paolini, R. A., Hoffman, B., Catmull, D. V., Malkoski, M., & Reynolds, E. C. (2005). Divalent metal cations increase the activity of the antimicrobial peptide kappacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 2322-2328.
- Di Mario, F., Aragona, G., Dal Bo, N., Cavestro, G. M., Cavallaro, L., Iori, V., Comparato, G., Leandro, G., Pilotto, A., Franze, A. (2003). Use of bovine lactoferrin for *Helicobacter* eradication. *Digestive and Liver Disease*, 35, 706-710.
- Dommett, R., Zilbauer, M., George, J. T. & Bajaj-Elliott, M. (2005). Innate immune defence in the human gastrointestinal tract. *Molecular Immunology*, 42, 903-912.
- El-Zahar, K., Sitohy, M., Choiset, Y., Métro, F., Haertlé, T. & Chobert, J.M. (2004). Antimicrobial activity of ovine whey protein and their peptic hydrolysates. *Milchwissenschaft* 59, 653-656.
- Florén, C. H., Chinenye, S., Elfstrand, L., Hagman, C. & Ihse, I. (2006). Coloplus, a new product based on bovine colostrums, alleviates HIV-associated diarrhoea. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 41, 682-686.
- Floris, R. Recio, I., Berkhout, B. & Visser, S. (2003). Antibacterial and antiviral effects of milk proteins and derivatives thereof. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1257-1275.
- Fox, P.F. (2003). Milk proteins: general and historical aspects. In P.F. Fox & P.L.H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry-1. Proteins* (pp. 1-49). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Furlong, S. J., Mader, J. S. & Hoskin, D. W. (2006). Lactoferricin-induced apoptosis in estrogen-nonresponsive MDA-MB-435 breast cell cancer cells is enhanced by C6 ceramide or tamoxifen. *Oncology Reports*, 15, 1385-1390.

- Ganz, T. & Weiss, J. (1997). Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. *Seminars of Hematology*, 34, 343-354.
- Gómez-Ruiz, J. Á., Recio, I., Pihlanto, A. (2005). Antimicrobial activity of ovine casein hydrolysates. A preliminary study. *Milchwissenschaft* 60 (1), 41-44
- Haney, E. F, Nazmi, K., Lau, F., Bolscher, J. G. M., Vogel, H. J. (2009). Novel lactoferrampin antimicrobial peptides derived from human lactoferrin. *Biochimie* 91, 141-154.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. & Schroder, J. M. (1997). A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 387, 861.
- Hayes, M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Hill, C. & Stanton, C. (2006). Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2260-2264.
- Hill, R. D., Lahov, E. & Givol, D. (1974). A rennin-sensitive bond in alpha and beta casein. *Journal of Dairy Research*, 41, 147-153.
- Hoek, K., Milne, J. M., Grieve, P. A., Dionoysius, D. A., & Smith, R. (1997). Antibacterial activity of bovine lactoferrin-derived peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 54-59.
- Ibrahim, H.R. (2003). Hen egg white lysozyme and ovotransferrin: Mystery, structural role and antimicrobial fuction. *Proceedings of the Xth European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products*. Saint-Brieuc, France. September, 2003, pp. 1113-1128.
- Ibrahim, H. R., Thomas, U., & Pellegrini, A. (2001). A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 43767-43774.
- Iigo, M., Kuhara, T., Ushida, Y., Sekine, K., Moore, M. A. & Tsuda, H. (1999). Inhibitory effects of bovine lactoferrin on colon carcinoma 26 lung metastasis in mice. *Clinical & Experimental Metastasis*, 17, 35-40.
- Isaacs, C.E. (2005). Human milk inactivates pathogens individually, additively and synergistically. *Journal of Nutrition*, 135, 1286-1288.
- Isamida, T., Tanaka, T., Omata, Y., Yamauchi, K., Shimazaki, K., & Saito, A. (1998). Protective effect of lactoferricin against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Journal of Veterinary Medical Science*, 60, 241-244.
- Jenssen, H., Hancock, R.E.W. (2009). Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie* 91, 19-29.

- Jia, H. P., Starner, T., Ackerman, M., Kirby, P., Tack, B. F. & McCray, P. B. (2001). Abundant human β -defensin-1 expression in milk and mammary gland epithelium. *Journal of Pediatrics*, 138, 109-112.
- Kawaguchi, S., Hayashi, T., Masano, H., Okuyama, K., Suzuki, T., & Kawase, K. (1989). Effect of lactoferrin-enriched infant formula on low birth weight infants. *Shuunakiigaku*, 19, 125-130. (in Japanese).
- Korhonen, H. & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16, 945-960.
- Kuwata, H., Yip, T.T., Tomita, M. & Hutchens, T.W. (1998a) Direct evidence of the generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1429, 129-141.
- Kuwata, H., Yip, T.T., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Hayasawa, Tomita, M. & Hutchens, T.W. (1998b). The survival of ingested lactoferrin in the gastrointestinal tract of adult mice. *Biochemistry Journal*, 334, 321-323.
- Lahov, E. & Regelson W. (1996). Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Federal Chemistry Toxicology*, 34, 131-145.
- Ledoux, N., Mahé, S., Dubarry. M., Bourras, M., Benamouzig, R. & Tomé, D. (1999). Intraluminal immunoreactive caseinomacropeptide after milk protein ingestion in humans. *Nahrung*, 43, 196-200.
- Lee, H. Y., Park, J. H., Seok, S.H., Baek, M. W., Kim, D. J., Lee, B. H., Kang, P. D., Kim, Y. S. & Park, J. H. (2005). Potencial antimicrobial effects of human lactoferrin against oral infection with *Listeria monocytogenes* in mice. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 1049-1054.
- Lehrer, R. I. & Ganz, T. (2002). Defensins of vertebrate animals. *Current Opinion in Immunology* 14, 96-102.
- León-Sicarios, N., Reyes-López, M., Ordaz-Pichardo, C. & de la Garza, M. (2006). Microbicidal action of lactoferrin and lactoferricin and their synergistic effect with metronizadole in *Entamoeba histolytica*. *Biochemistry and Cell Biology*, 84, 327-336.
- Levay, P. F & Viljoen, M. (1995). Lactoferrin, a general review. *Haematologica*, 80, 252-267.
- Liepke, C., Zucht, H. D, Forssman, W. G & Ständker, L. (2001). Purification of novel peptide antibiotics from human milk. *Journal of Chromatography B*, 752, 369-377.

- López-Expósito, I. & Recio, I. (2006a). Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16, 1294-1305.
- López-Expósito, I., Gómez-Ruiz, J. A, Amigo, L. & Recio, I. (2006b). Identification of antibacterial peptides from ovine α_{s2} -casein. *International Dairy Journal*, 16, 1072-1080.
- López-Expósito, I., Minervini, F., Amigo, L. & Recio, I. (2006c). Identification of antibacterial peptides from bovine κ -casein. *Journal of Food Protection*. 69, 2992-2997.
- López-Expósito, I., Recio, I. (2008). Protective effect of milk peptides: Antibacterial and antitumoral properties. In: *Bioactive components of milk*. Springer-Verlag. Berlin. (Alemania), vol 606, 271-293.
- López-Expósito, I., Pellegrini, A., Amigo, L. & Recio, I (2008a). Synergistic effect between different milk-derived peptides and proteins. *Journal of Dairy Science*, 91, 2184-2189.
- López-Expósito, I., Pellegrini, A., Amigo, L. & Recio, I (2008b). Identification of the initial binding sites of α_{s2} -casein f(183-207) and effect on bacterial membranes and cell morphology. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1778, 2444-2449.
- López-Expósito, I., Quirós, A., Amigo, L. & Recio, I. (2007). Casein hydrolysates as source of antimicrobial, antioxidant and antihypertensive peptides. *Le Lait* 87 4-5 241-249
- Malkoski, M., Dashper, S. G., O'Brien-Simpson, N. M, Talbo, G. H., Macris, M., Cross, K. J. & Reynolds, E. C. (2001). Kappacin, a novel antimicrobial peptide from bovine milk. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 2309-2315.
- Marshall, K. (2004). Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Review*, 9, 136-156.
- Masschalck, B. & Michiels, C. W. (2003). Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 29, 191-214.
- McCann, K. B., Shiell, B.J, Michalski, W. P, Lee, A., Wan, J., Roginski, H. & Coventry, M. J. (2006). Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine α_{s1} -casein. *International Dairy Journal*, 16, 316-323.
- Y.Mine,F. P. Ma, and S. Lauriau. (2004). Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (5):1088-1094.

- Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C. G, Fox, P. F., Monnet, V. & Gobetti, M. (2003). Angiotensin I-Converting-Enzyme-Inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 Proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5297-5305.
- Muñoz, A. & Marcos, J. F. (2006). Activity and mode of action against fungal phytopathogens of bovine lactoferrin-derived peptides. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 1199-1207.
- Murakami, M., Dorschner, R. A., Stern, L. J., Lin, K. H. & Gallo, R. L. (2005). Expression and secretion of cathelicidin antimicrobial peptides in murine mammary glands and human milk. *Pediatric Research*, 57, 10-15.
- Nakasone, Y., Adjei, A., Yoshise, M., Yamauchi, K., Takase, M., Yamauchi, K., Shimamura, S. & Yamamoto, S. (1994). Effect of dietary lactoferricin on the recovery of mice infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Abstract *Annual Meeting of the Japanese Society of Nutritional Food Science* (in Japanese) p. 50.
- Nazarowec-White, M. & Farber, J. M. (1997). Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried infant formula. *Letters in Applied Microbiology*, 24, 9-13.
- Newburg, D. S. (2005). Innate immunity and human milk. *Journal of Nutrition*, 135, 1308-1312.
- Ochoa, T. J., Cleary T. G. (2009) Effect of lactoferrin on enteric pathogens. *Biochimie* 91, 30-34.
- Okumura, K., Itoh, A., Isogai, E. Hirose, K., Hosokawa, Y., Abiko, Y., Shibata, T. Hirata, M. & Isogai, H. (2004). C-terminal domain of human CAP18 antimicrobial peptide induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma SAS-H1 cells. *Cancer Letters*, 212, 185-194.
- Pakkanen, R. & Aalto, J (1997). Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrums. *International Dairy Journal*, 7, 285-297.
- Pellegrini, A. (2003). Antimicrobial peptides from food proteins. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1225-1238.
- 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*, 1526, 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, 439-448.
- Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Klauser, S., Humziker, P. & von Fellenberg, R. (1997). Identification and isolation of a bactericidal domain in chicken egg white lysozyme. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 372-378.
- Piertrantoni, A., Ammendolia, M. G., Tinari, A., Siciliano, R., Valenti, P. & Superti, F. (2006). Bovine lactoferrin peptidic fragments involved in inhibition of Echovirus 6 in vitro infection. *Antiviral Research*, 69, 98-106.
- Porter, E. M., Dam, E. V., Valore, E. V. & Ganz, T. (1997). Broad-spectrum antimicrobial activity of human intestinal defensin 5. *Infection and Immunology*, 65, 2396-2401.
- Proulx, M., Gauthier, S. F. & Roy, D. (1992). Effect of casein hydrolysates on the growth of Bifidobacteria. *Le lait*, 72, 393-404.
- Recio, I. & Visser, S. (1999a). Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine α_{s2} -casein. *Biochimica et Biophysica acta*, 1428, 314-326.
- Recio, I., & Visser, S. (1999b). Two ion-exchange chromatographic methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin. In situ enzymatic hydrolysis on an ion-exchange membrane. *Journal of Chromatography A*, 831, 191-201.
- Recio, I., & Visser, S. (2000). Antibacterial and binding characteristics of bovine, ovine and caprine lactoferrins: a comparative study. *International Dairy Journal*, 10, 597-605.
- Salzmann, N. H., Polin, R. A., Harris, M. C., Ruchelli, E., Hebra, A., Zirin-Butler, S., Jawad, A., Porter, E. M. & Bevins, C. L. (1998). Enteric defensin expresión in necrotizing enterocolitis. *Pediatric Research*, 44, 20-26.
- Schiffer, M., Chang, C. H., & Stevens, F. J. (1992). The functions of tryptophan residues in membrane proteins. *Protein Engineering*, 5, 213-214.
- Silva, S. V., Malcata, F. X. (2005). Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15, 1-15.
- Smith, J.A, Wilkinson, M.C. & Liu, Q.M. (1997). Casein fragments having growth promoting activity. *International patent WO 97/16460*.
- Strøm M. H., Haug, B. E., Rekdal, O., Skar, M. L., Stensen, W. & Svendsen, J. S. (2002). Important structural features of 15 residue lactoferricin derivatives and methods for improvement of antimicrobial activity. *Biochemistry and Cell Biology*, 80, 65-74.

- Teraguchi, S., Ozawa, K., Yasuda, S., Shin, K., Fukuwatari, Y. & Shimamura, S. (1994). The bacteriostatic effects of orally administered bovine lactoferrina on intestinal Enterobacteriaceae of SPF mice fed bovine milk. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 58, 482-487.
- Teraguchi, S., Shin, K., Ogata, T., Kingaku, M., Kaino, A., Miyauchi, H., Fukuwatari, Y., & Shimamura, S. (1995). Orally administered bovine lactoferrin inhibits bacterial translocation in mice fed bovine milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 4131-4134.
- Tomita, M., Wakabayashi, H., Shin, K., Yamauchi, K., Yaeshima, T., Iwatsuki, K. (2009) Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. *Biochimie* 91, 52-57.
- Tomita, M., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S. & Hayasawa, H. (2002). Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochemistry and Cell Biology*, 80, 109-112.
- Tunzi, C. R., Harper, P. A., Bar-Oz, B., Valore, E.V., Semple, J. L., Watson-MacDonell, J. Ganz, T. & Ito, S. (2000). β -Defensin expression in human mammary gland epithelia. *Pediatric Research*, 48, 30-35.
- Turner, J., Cho, Y. Dinh, N. N., Waring, A. J. & Lehrer, R. I. (1998). Activities of LL37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, 2206-2214.
- Ulvatne, H., Samuelsen, Ø., Haukland, H. H., Krämer, M., Vorland, L. H. (2004). Lactoferricin B inhibits bacterial macromolecular synthesis in Escherichia coli and Bacillus subtilis. *FEMS Microbiology Letters*, 237, 377-384.
- Valore, E. V., Park, C. H., Quayle, A. J., Wiles, K. R., McCray, P. B. & Ganz, T. (1998). Human β -defensin-1, an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *Journal of Clinical Investigation*, 101, 1633-1642.
- van der Kraan, M. I. A., Groenink, J., Nazmi, K., Veerman, E. C. I., Bolscher, J. G. M., & Nieuw Amerongen, A. V. (2004). Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. *Peptides*, 25, 177-183.
- van Hooijdonk, A. C. M., Kussendrager, K. D. & Steijns, J. M. (2000). In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrums involved in non-specific defence. *British Journal of Nutrition*, 84, 127-134.
- Vogel, H. J., Schibli, D. J., Weiguo, J., Lohmeier-Vogel, E. M., Epand, R. F. & Epand, R. M. (2002). Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and

- related tryptophan and arginine containing peptides. *Biochemistry and Cell Biology*, 80, 49-63.
- Vorland, L. H., Ulvatne, H., Andersen, J., Haukland, H. H., Rekdal, Ø., Svendsen, J. S., & Gutteberg, T. J. (1998). Lactoferricin of bovine origin is more active than lactoferricins of human, murine and caprine origin. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 30, 513-517.
- Wakabayashi, H., Kuwata, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S. & Yoshitaka, T. (2004). No detectable transfer of dietary lactoferrin or its multifunctional fragments to portal blood in healthy adults rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68, 853-860.
- Wakabayashi, H., Takase, M. & Tomita, M. (2003). Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1277-1287.
- Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Takase, M. (2006). Lactoferrin: research, technology and applications. *International Dairy Journal*, 16, 1241-1251.
- Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S. N., Chen, Q., Buffo, M. J., Shogan, J., Anderson, M., Schroder, J. M., Wang, J. M., Howard, O. M. Z. & Oppenheim, J. J. (1999). Beta-defensins: linking innate and adaptative immunity through dendritic and T-cell CCR6. *Science*, 286, 525-528.
- Zanetti, M. (2004). Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J. Leukocyte Biology*, 75, 39-48.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415, 389-395.

Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas lácteas.

Blanca Hernández-Ledesma^a, María del Mar Contreras, Isidra Recio, Mercedes Ramos*
Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC) Juan de la Cierva, 3. 28006 Madrid, España

** Correspondencia: Dr. M. Ramos*

Tel.: +34 91 5622900 Fax: +34 91 5644853

E-mail: mramos@ifi.csic.es

*^a Dirección actual: Department of Nutritional Sciences and Toxicology, University of California
Berkeley, 119 Morgan Hall, Berkeley CA 94720, USA*

1. Introducción

La leche es una excelente fuente de nutrientes. Mas allá de su bien documentada función nutricional, la leche ejerce un amplio rango de actividades biológicas que influyen sobre el sistema digestivo y metabólico, el crecimiento y desarrollo de los órganos y la resistencia a diversos trastornos y enfermedades. Estas actividades han sido atribuidas principalmente a las proteínas y péptidos secretados en la leche por la glándula mamaria. Sin embargo, algunas de las actividades biológicas de las proteínas lácteas se encuentran en un estado latente y requieren de procesos de proteólisis para su liberación. Así, los péptidos bioactivos corresponden a fragmentos inactivos dentro de la secuencia de la proteína precursora, pero que pueden liberarse mediante hidrólisis *in vivo* (durante la digestión gastrointestinal) o *in vitro* (durante el procesamiento de los alimentos) y en esta forma pueden ejercer distintas funciones fisiológicas en el organismo. Se han descrito péptidos bioactivos con diferentes actividades biológicas (antihipertensiva, opiácea, antitrombótica, inmunomodulante, hipocolesterolémica, antioxidante, antiviral, antiproliferativa, etc) y han sido revisados en numerosos artículos (por ejemplo, Hernández-Ledesma y col., 2006; Korhonen y Pihlanto, 2006). Por ello, los péptidos bioactivos derivados de proteínas lácteas juegan un papel importante en la salud y la nutrición. Generalmente

estos péptidos contienen entre 3 y 20 aminoácidos por molécula y su secuencia primaria define su función. Para que un péptido bioactivo ejerza la actividad tras su administración oral, es necesario que la forma activa del péptido sea resistente al proceso de digestión gastrointestinal, se produzca la absorción del mismo a través del epitelio gastrointestinal y alcance los órganos diana intacto o en forma de metabolitos activos. En este capítulo se revisa el estado actual de las investigaciones que se han llevado a cabo en los últimos años sobre péptidos antihipertensivos derivados de proteínas lácteas.

2. Péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y péptidos antihipertensivos

La hipertensión arterial es uno de los principales riesgos de las enfermedades cardiovasculares y afecta aproximadamente a una cuarta parte de la población mundial (Fitzgerald y Murray, 2006). La presión arterial está regulada parcialmente por el sistema renina-angiotensina. Uno de los principales componentes de este sistema es la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (EC 3.4.15.1.). Esta enzima multifuncional se localiza en diversos tejidos y es conocida por su primordial y decisivo papel en la regulación de la presión arterial ya que cataliza la conversión de la Angiotensina I, un decapeptido inactivo, en Angiotensina II, un octapeptido de potente acción vasoconstrictora. Además, esta enzima cataliza la inactivación de las bradiquininas, compuestos con una importante actividad vasodilatadora. Por tanto, la inhibición de esta enzima provoca principalmente un efecto hipotensor.

Tras el descubrimiento del papel de la dieta en la prevención y tratamiento de la hipertensión, los esfuerzos de científicos e industrias alimentarias se han enfocado en la búsqueda de alimentos con actividad antihipertensiva. Proteínas de diversos alimentos, como los huevos, el atún, la gelatina y la soja, han sido descritas como precursoras de péptidos con actividad inhibidora de la ECA (actividad IECA) *in vitro* o

actividad antihipertensiva *in vivo*. Sin embargo, hasta la actualidad, las proteínas lácteas son la principal fuente de estos péptidos bioactivos (Hartmann y Meisel, 2007).

Estos péptidos inhibidores de la ECA corresponden a diversos fragmentos de las caseínas conocidos como casoquininas, y a fragmentos derivados de las proteínas de suero, denominados lactoquininas. Debido a la relevancia de este grupo de péptidos bioactivos, en los últimos años se ha llevado a cabo una exhaustiva investigación enfocada en la identificación de nuevas secuencias peptídicas, así como en la elucidación de la relación estructura/actividad y el método de producción de dichas secuencias. Los resultados de esta investigación han sido descritos en múltiples artículos de revisión (Korhonen y Pihlanto, 2003; Fitzgerald y Murray 2006; Hernández-Ledesma y col., 2006, 2007b). Incluso, aspectos relacionados con la biodisponibilidad de estos péptidos y sus propiedades fisiológicas, químicas y tecnológicas han sido revisadas por otros autores (López-Fandiño y col., 2006; Vermeirssen y col., 2004).

Relación estructura actividad

La relación estructura/actividad de los péptidos inhibidores de la ECA no está totalmente definida. Sin embargo, numerosas investigaciones han demostrado la importante influencia de los tres aminoácidos situados en el extremo carboxilo terminal sobre la unión a la enzima. La ECA tiene afinidad por substratos o inhibidores competitivos que contengan residuos hidrofóbicos en cualquiera de las tres últimas posiciones del extremo carboxilo terminal. Estudios de inhibición llevados a cabo con di-péptidos de diversa estructura han concluido que los aminoácidos Trp, Tyr, Phe o Pro presentes en estas posiciones del extremo C-terminal son más efectivos para la unión del inhibidor a la ECA. Además, la unión se ve favorecida si el péptido contiene el aminoácido Pro como último o antepenúltimo residuo, viéndose debilitada si este aminoácido ocupa la posición penúltima en la secuencia peptídica (Cheung y col.,

1980). La potencia inhibidora del péptido también se ve favorecida por la presencia de la carga positiva de los aminoácidos Lys o Arg en el extremo C-terminal. En los últimos años se han utilizado técnicas bioinformáticas para poder establecer los requisitos estructurales que deben presentar los péptidos inhibidores de la ECA, son los denominados modelos de relación estructura-actividad cuantitativos (QSAR). Así, mediante un modelo QSAR para péptidos de hasta 6 aminoácidos derivados de proteínas lácteas, Pripp y col. (2004) pudieron concluir que había una relación entre la actividad IECA y la presencia de un aminoácido hidrofóbico o cargado positivamente en la última posición de la secuencia, sin embargo, no se encontró ninguna relación entre la estructura del extremo N-terminal. Por otro lado, Wu y col. (2006) a través de un modelo QSAR para péptidos que contenían entre 4 y 10 aminoácidos observaron que el residuo del tetrapéptido del C-terminal puede decidir la potencia IECA, siendo preferentes los aminoácidos Tyr y Cys en primera posición del C-terminal, en segunda posición His, Trp y Met, en tercera posición Ile, Leu, Val y Met y en cuarta posición Trp. De este modo, péptidos que presentan el tripéptido C-terminal idéntico, pueden poseer actividades muy diferentes dependiendo de su secuencia y del aminoácido adyacente al tripéptido C-terminal. Por ejemplo, Gómez-Ruiz y col. (2004a) observaron que el péptido de secuencia VRYL era más activo que el péptido VPSELYL, ambos identificados en un queso Manchego.

Por otro lado, la configuración que puede adoptar el péptido dependiendo de las condiciones ambientales y la conformación estructural final que puede adquirir el péptido pueden ser determinantes de la actividad IECA. De tal forma, las secuencias que contienen *trans*-Pro en su extremo C-terminal son mejores sustratos de la enzima que las que contienen *cis*-Pro, como ejemplo cabe citar el estudio llevado a cabo por Gómez-Ruiz y col. (2004b). Los isómeros L y D de los aminoácidos en algunas

posiciones de la secuencia peptídica también influyen en la estereoespecificidad de la ECA (Maruyama y col., 1987).

Biodisponibilidad

El potencial antihipertensivo de un péptido es dependiente de su capacidad para alcanzar, sin ser degradados por las enzimas intestinales o sanguíneas, los órganos diana, tanto en el margen luminal del tracto intestinal como en los órganos periféricos. La resistencia a estas enzimas es un requisito esencial para el efecto antihipertensivo de péptidos inhibidores de la ECA tras su ingestión oral o su administración por vía intravenosa. Por lo tanto, es importante distinguir entre péptidos cuya actividad antihipertensiva ha sido demostrada mediante estudios *in vivo* en animales de experimentación y ensayos clínicos en humanos y péptidos cuya actividad ha sido sólo evaluada mediante ensayos *in vitro*. Diversos autores han descrito un incremento de la actividad IECA tras la acción de enzimas digestivas sobre soluciones de caseína fermentada (Pihlanto-Leppälä y col., 1998; Vermeirssen y col., 2003). Sin embargo, en otros casos, la digestión gastrointestinal es responsable de la hidrólisis de potentes péptidos inhibidores de la ECA y la consecuente pérdida de su actividad antihipertensiva *in vivo*. Así, por ejemplo, el péptido correspondiente al fragmento 142-148 de la β -lactoglobulina, conocido por su elevada actividad IECA *in vitro*, no es resistente a la acción de las proteinasas y peptidasas intestinales y sanguíneas (Walsh y col., 2004). Igualmente, Maruyama y colaboradores (1987) demostraron que el fragmento 23-27 de la α_{s1} -caseína presentaba una elevada capacidad inhibidora de la ECA y un nulo efecto antihipertensivo *in vivo*.

2.1. Péptidos con actividad IECA y antihipertensivos derivados de proteínas lácteas por fermentación microbiana

En leches fermentadas

Los procesos de fermentación microbiana se han considerado como una de las mejores estrategias en la obtención de péptidos inhibidores de la ECA y/o péptidos antihipertensivos derivados de proteínas lácteas. Durante los procesos de fermentación, las enzimas presentes en los microorganismos degradan las caseínas permitiendo la liberación de péptidos y aminoácidos esenciales para su crecimiento. Algunos de estos péptidos han sido identificados y caracterizados como inhibidores de la ECA y/o antihipertensivos. En la tabla 1 se muestran aquellos péptidos identificados hasta la actualidad como responsables del efecto antihipertensivo de productos lácteos fermentados.

Diferentes especies de bacterias lácticas han demostrado la capacidad de fermentar la leche generando productos fermentados con elevada actividad IECA. La combinación de las cepas *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae*, empleadas durante la elaboración de una leche fermentada comercializada en Japón (Nakamura y col., 1995a) (Calpis, Calpis Co. Ltd., Tokyo, Japan), es esencial en la producción de péptidos con un demostrado efecto antihipertensivo tanto en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Nakamura y col., 1995b) como en pacientes hipertensos (Hata y col., 1996). De una manera similar, un producto generado tras la fermentación de la leche con *Lactobacillus helveticus* LBK-16H ejerció un significativo efecto antihipertensivo en un ensayo clínico llevado a cabo con humanos hipertensos (Seppo y col., 2002; 2003). Este producto ha sido comercializado con el nombre de Evolus® (Valio Ltd, Finlandia o Kaiku Vitabrand®, España). En ambos productos, los péptidos Ile-Pro-Pro (IPP) y Val-Pro-Pro (VPP) fueron identificados como responsables del efecto antihipertensivo de los mismos (Sipola y col., 2001). Además, la presencia de estos tri-péptidos fue detectada tras su administración oral en la arteria aorta de

ratas SHR, siendo considerado como el órgano diana en el efecto antihipertensivo (Masuda y col., 1996). Recientemente, la compañía francesa Danone está comercializando el producto Danatén® en España que también contiene estos tri-péptidos y ha sido fabricado con una nueva cepa de *Lactobacillus helveticus* (Degivry, M-C., 2007; Garault, 2007; Queguiner, 2007).

Otros péptidos con actividad IECA fueron aislados y caracterizados a partir de una leche fermentada con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Gobbetti y col., 2000; Ashar y Chand, 2004). Hernández-Ledesma y col. (2004) estudiaron la actividad IECA de leches fermentadas comerciales, mostrando la mayoría una moderada actividad. Esta actividad se mantenía estable o aumentaba durante el proceso de simulación gastrointestinal. Asimismo, se han identificado péptidos cuyas características estructurales son similares a péptidos con actividad IECA previamente descritos. Además de productos lácteos de origen bovino, la actividad IECA de yogures fabricados con leche ovina (Chobert y col., 2005) y kéfir de leche de cabra (Quirós y col., 2005) ha sido investigada. En este último producto se ha identificado el péptido de secuencia PYVRYL (fragmento 203-208 de la α_{s2} caseína) que exhibe una potente actividad IECA (IC_{50} de 2,4 μ M) y antihipertensiva en ratas SHR (Recio y col., 2006).

Recientemente, Nielsen y col. (2009) han estudiado el efecto de la cepa, pH de la fermentación (4.6, 4.3 y 3.5) y tiempo de almacenamiento (de 1 a 7 días a 5 °C) sobre el perfil peptídico y actividad IECA en 13 cepas de la colección de Hansen. Las cepas que mostraron mayor actividad IECA correspondieron a dos de las cepas de *Lactobacillus helveticus* empleadas y a las cepas de *Lactococcus lactis*.

Nuestro grupo de investigación en colaboración con la empresa Leche Pascual, evaluaron la actividad IECA de diferentes leches fermentadas producidas con 231 cepas de microorganismos aisladas de muestras de leche de vaca cruda. Entre ellas,

Tabla 1. Actividad IECA y actividad antihipertensiva en ratas espontáneamente hipertensas de péptidos derivados de caseínas y proteínas de suero obtenidos por procesos de fermentación microbiana (Adaptada de Hernández-Ledesma y col., 2006).

Fragmento peptídico	Secuencia ^a	IC ₅₀ ^b (μM)	Máximo descenso de la PSS (mmHg) ^c	Origen	Referencia
α _{s1} -CN f(1-9)	RPKHPIKHQ	13.4	-9.3	Queso Gouda	Saito y col., 2000
α _{s1} -CN f(146-147)	YP	720	-32.1	Fermentación con <i>Lactobacillus helveticus</i> CPN4	Maeno y col., 1996
β-CN f(58-76)	LVYFPGIPNS LPQNIPP	5.2	-15.0	Fermentación con <i>Enterococcus faecalis</i>	Miguel y col., 2006; Quiros y col., 2007
β-CN f(60-68)	YPFPGIPN	14.8	-7.0	Queso Gouda	Saito y col., 2000
β-CN f(74-76)	IPP	5.0	-28.3 (-10.1) ^d	Fermentación con <i>L. helveticus</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nakamura y col., 1995a, b
β-CN f(84-86)	VPP	9.0	-32.1 (-10.1) ^d	Fermentación con <i>L. helveticus</i> y <i>S. Cerevisiae</i>	Nakamura y col., 1995a, b
β-CN f(133-138)	LHLPLP	5.5	-21.9	Fermentación láctea con <i>E. faecalis</i>	Miguel y col., 2006; Quiros y col., 2007
β-CN f(133-139)	LHLPLPL	425	-7.7	Fermentación con <i>E. faecalis</i>	Miguel y col., 2006; Quiros y col., 2007
β-CN f(197-206)	VLGPVRGPFP	137	-16.2	Fermentación con <i>E. faecalis</i>	Miguel y col., 2006; Quiros y col., 2007
β-CN f(201-209)	VRGPFPIIV	599	-16.1	Fermentación con <i>E. faecalis</i>	Miguel y col., 2006; Quiros y col., 2007

^a: Código de una letra de la secuencia de aminoácidos

^b: Concentración de péptido necesaria para inhibir el 50% de la actividad original de la enzima ECA

^c: Presión sanguínea sistólica (valor medio)

^d: Efecto antihipertensivo en humanos

cuatro cepas de *Enterococcus faecalis* producían leches fermentadas con potente actividad IECA y efecto antihipertensivo en ratas SHR (Muguerza y col., 2006). Se identificaron ocho péptidos en estas leches fermentadas, y se determinó la actividad antihipertensiva tras su administración por vía oral. Dos de estos péptidos, que correspondieron a los fragmentos 133-138 y 58-76 de la β -caseína (LHLPLP y LVYPFPGPIPNLQNIIP, respectivamente) mostraron valores de IC_{50} inferiores de 5 μ M y un potente efecto antihipertensivo en ratas SHR (Miguel y col., 2006; Quirós y col., 2007) (Tabla 1). Se comprobó también que el producto obtenido por fermentación con estas cepas disminuía el desarrollo de la hipertensión durante un estudio crónico en ratas hipertensas (Miguel y col., 2005). Para profundizar en el estudio de los péptidos más activos, se ha estudiado la biodisponibilidad de los mismos mediante procesos de simulación gastrointestinal y estudios de transporte a través de células Caco-2. Se pudo comprobar que el LHLPLP fue el único péptido que resistió la hidrólisis con enzimas digestivas. Sin embargo, este péptido fue hidrolizado por las peptidasas de las células del epitelio intestinal dando lugar al péptido HLPLP. Este penta-péptido es transportado a través de la monocapa de células Caco-2, siendo la difusión pasiva el principal mecanismo de transporte de este péptido. Además, el péptido HLPLP es resistente a las peptidasas plasmáticas humanas, por lo que podría ser la forma activa del péptido LHLPLP (Quirós y col, 2008).

En quesos

Durante la maduración del queso, pueden formarse péptidos con actividad IECA por acción de las proteinasas asociadas a la pared celular de las bacterias lácticas y de las peptidasas intracelulares. Saito y col. (2000) determinaron la actividad IECA y antihipertensiva de la fracción peptídica de quesos comerciales, como el Gouda, Edam, Emmental, Camembert, Havarti y queso Azul. De las 6 tipos de queso examinados, 4 de ellos mostraron efecto antihipertensivo siendo el queso Gouda de 8

meses de maduración el que presentaba mayor actividad antihipertensiva cuando se administraba a ratas SHR. Se han identificado en dicho queso los fragmentos 60-68 de β -caseína y 1-9 de α_{s1} -caseína, que presentaron una potente actividad IECA, con valores de IC_{50} de 14.8 y 13.4 μ M, respectivamente, pero una débil actividad antihipertensiva. Este último fragmento también ha sido identificado en el queso Festivo, un nuevo tipo de queso bajo en grasa, desarrollado en Finlandia (Ryhänen y col., 2001). Varios péptidos inhibidores de la ECA han sido aislados de extractos procedentes de quesos comercializados en Italia y España (Gómez-Ruiz y col., 2006; Smacchi y Gobbetti, 1998), así como de un queso Manchego preparado tras la inoculación de leche con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Leuconostoc mesenteroides* (Gómez-Ruiz y col., 2002). Más recientemente, Bütikofer y col. (2007; 2008) han determinado la concentración de los péptidos antihipertensivos VPP e IPP en 44 muestras de quesos comerciales duros y semi-duros y en 101 muestras de 10 variedades distintas de Quesos suizos. En general, se observó que el péptido VPP estaba en más alta concentración que el IPP y que existían diferencias en la concentración de los péptidos entre los diferentes quesos. La concentración más alta de los tripéptidos se encontró en una variedad de queso Appenzeller.

2.2. Péptidos con actividad IECA y antihipertensivos derivados de proteínas lácteas por hidrólisis enzimática

Un gran número de estudios llevados a cabo durante las últimas dos décadas han demostrado la formación de péptidos inhibidores de la ECA y/o antihipertensivos a partir de hidrolizados de proteínas lácteas. Estos péptidos se muestran en la Tabla 2. Los péptidos inhibidores de la ECA más potentes ($IC_{50} < 30 \mu$ M) proceden de hidrolizados de caseinatos y caseínas con tripsina o con la proteinasa extracelular de

Lactobacillus helveticus (Maruyama y col., 1987; Robert y col., 2004; Tauzin y col., 2002; Yamamoto y col., 1994).

Con el objetivo de poder obtener los péptidos VPP e IPP por hidrólisis enzimática, en lugar de por fermentación, se ha producido un hidrolizado de caseínas con una proteasa de *Aspergillus oryzae*. Además, este hidrolizado presenta una potente actividad IECA y antihipertensiva en ratas (Mizuno y col., 2004) y en humanos (Mizuno y col., 2005; Sano y col., 2005). A partir de este hidrolizado, Calpis ha diseñado AmealPeptide®, también conocido como Lactotripeptide™ (LTP). En Estados Unidos también se comercializa como el ingrediente del suplemento dietético Ameal bp™. Recientemente, un hidrolizado que contiene el péptido IPP ha sido producido mediante la hidrólisis del glicomacropéptido de origen bovino con una preparación enzimática derivada de *Aspergillus niger*. Este producto se comercializa como Tensguard™ por la compañía holandesa DSM Food Specialties. Ponstein-Simarro Doorten y col. (2009) han llevado a cabo estudios toxicológicos de este producto mediante ensayos de genotoxicidad *in vitro* y estudios de toxicidad *in vivo* en ratas.

Además, también ha sido comercializado un hidrolizado de caseína con tripsina con propiedades antihipertensivas en Japón bajo el nombre de Casein DP (Kanebo Ltd.) (Sekiya y col., 1992; Sugai, 1998). Posteriormente, otro hidrolizado láctico de caseína se comercializó en Holanda bajo la denominación de C12 Peption™ (DMV internacional) (Cadee y col., 2007). Ambos productos presentan el fragmento 23-34 de α_{s1} -caseína de secuencia FFVAPFPEVFGK.

En nuestro laboratorio, Recio y col. (2006), han identificado, dos nuevas secuencias peptídicas derivadas de la α_{s1} caseína con actividad IECA y potente actividad antihipertensiva en el hidrolizado de caseína con pepsina. También se ha demostrado el efecto antihipertensivo en ratas SHR, de un hidrolizado de caseínas con pepsina y la fracción menor de 3000 Da del hidrolizado (Miguel y col., 2009).

Tabla 2. Actividad inhibidora de la enzima convertidora de la Angiotensina y actividad antihipertensiva en ratas espontáneamente hipertensas de péptidos derivados de caseínas y proteínas de suero por procesos de hidrólisis enzimática (Adaptada de Hernández-Ledesma y col., 2006).

Fragmento peptídico	Secuencia ^a	IC ₅₀ (μM) ^b	Máximo descenso de la PSS (mmHg) ^c	Origen	Referencia
α _{s1} -CN f(23-34)	FFVAPFPGVFGK	77	-34.0	Hidrólisis con tripsina	Karaki y col., 1990
α _{s1} -CN f(104-109)	YKVPQL	22	-13.0	Hidrólisis con una proteinasa de <i>Lactobacillus helveticus</i> CP790	Maeno y col., 1996
α _{s1} -CN f(194-199)	TTMPLW	16	-13.6	Hidrólisis con tripsina	Karaki y col., 1990
α _{s2} -CN f(189-192)	AMPKPW	580	-5.0	Hidrólisis con una proteinasa de <i>L. helveticus</i> CP790	Maeno y col., 1996
α _{s2} -CN f(190-197)	MKPWIQPK	300	-3.0	Hidrólisis con una proteinasa de <i>L. helveticus</i> CP790	Maeno y col., 1996
α _{s2} -CN f(198-202)	TKVIP	400	-9.0	Hidrólisis con una proteinasa de <i>L. helveticus</i> CP790	Maeno y col., 1996
α _{s2} -CN f(203-208) ^d	PYVRYL	1.9	23.4	Hidrólisis con pepsina	Recio y col., 2006
β-CN f(59-61)	VYP	288	-21.0	Hidrólisis con proteinasa K	Abubakar y col., 1998
β-CN f(59-64)	VYPFPG	221	-22.0	Hidrólisis con proteinasa K	Abubakar y col., 1998
β-CN f(80-90)	TPVVPPFLQP	749	-8.0	Hidrólisis con proteinasa K	Abubakar y col., 1998
β-CN f(140-143)	LQSW	500	-2.0	Hidrólisis con una proteinasa de <i>L. helveticus</i> CP790	Maeno y col., 1996
β-CN f(169-174)	KVLVP	5	-32.2	Hidrólisis con una proteinasa de <i>L. helveticus</i> CP790	Maeno y col., 1996
β-CN f(169-175)	KVLVPVQ	1000	-31.5	Hidrólisis con una proteinasa de <i>L. helveticus</i> CP790	Maeno y col., 1996
β-CN f(177-183)	AVPYPQR	15	-10.0	Hidrólisis con tripsina	Karaki y col., 1990
α-La f(50-53)	YGLF	733	-23.0	Hidrólisis con enzimas gástricas y pancreáticas	Nurminen y col., 2000
β-Lg f(58-61) ^e	LQKW	34.7	-18.1	Hidrólisis con termolisina	Hernández-Ledesma y col., 2007a
β-Lg f(78-80)	IPA	141	-31.0	Hidrólisis con proteinasa K	Abubakar y col., 1998
β-Lg f(103-105) ^e	LLF	79.8	-29.0	Hidrólisis con termolisina	Hernández-Ledesma y col., 2007a
β-Lg f(142-145)	ALPM	928	-21.4	Producto de suero comercial	Murakami y col., 2004
β ₂ -m f(18-20)	GKP	352	-26.0	Hidrólisis con proteinasa K	Abubakar y col., 1998
BSA f(221-222)	FP	315	-27.0	Hidrólisis con proteinasa K	Abubakar y col., 1998

^a. Código de una letra de la secuencia de aminoácidos

^b. Concentración de péptido necesaria para inhibir el 50% de la actividad original de la enzima ECA

^c. Presión sanguínea sistólica (valor medio)

^d. Proteína de origen ovino

^e. Proteína de origen caprino

^f. β₂-microglobulina

Respecto a las proteínas de suero, la hidrólisis con una combinación de enzimas digestivas u otras enzimas con alto poder proteolítico y baja especificidad, como la termolisina o la proteinasa K, permite la producción de hidrolizados con un gran número de potentes péptidos inhibidores de la ECA (Abubakar y col., 1998; Hernández-Ledesma y col., 2002; Mullally y col., 1997; Nurminen y col., 2000; Pihlanto-Leppälä y col., 2000). Por ejemplo, el péptido denominado β -lactosin A [IPA, f(78-80)], se ha identificado en un hidrolizado de β -lactoglobulina con proteinasa K. Aunque este péptido mostró una moderada actividad IECA, presentó una potente actividad antihipertensiva en ratas SHR (Abubakar y col., 1998). En un estudio con un hidrolizado de β -lactoglobulina de cabra preparado con termolisina, se identificaron dos potentes inhibidores de la ECA, de secuencias LLF y LQKW, y posteriormente, se demostró su efecto antihipertensivo en ratas SHR (Hernández-Ledesma y col., 2002 y 2007a).

La hidrólisis de α -lactalbúmina con enzimas gástricas y pancreáticas produjo la liberación del tetra-péptido YGLF que presentó actividad opiácea y antihipertensiva en ratas normotensas y SHR, siendo esta última actividad debida a su efecto como antagonista de receptores opiáceos (Ijäs y col., 2004). Estos resultados sugieren que otros mecanismos de acción, diferentes a la inhibición de la ECA pueden estar involucrados en el efecto antihipertensivo de péptidos derivados de proteínas lácteas.

3. Perspectivas futuras

Un elevado número de estudios llevados a cabo *in vitro* e *in vivo* revelan que los péptidos antihipertensivos pueden ser liberados a partir de proteínas lácteas tras procesos de fermentación microbiana y/o hidrólisis enzimática. Estos péptidos bioactivos no son tan potentes como los fármacos usados de forma común en el tratamiento de la hipertensión. Sin embargo, pueden considerarse como una fuente altamente interesante de ingredientes bioactivos que se puede incorporar en alimentos y ser usados en la prevención de la hipertensión arterial y consecuentemente de los trastornos cardiovasculares, manteniendo un adecuado estado de salud.

El diseño de nuevos productos lácteos promotores de la salud conteniendo estos péptidos aparece prometedor y atractivo para productores y consumidores. Sin embargo, sería necesario: A) Una investigación más exhaustiva que resuelva diversos aspectos científicos y tecnológicos de la aplicación de péptidos bioactivos como ingredientes de alimentos funcionales y nutracéuticos. B) El desarrollo de estrategias para la producción y enriquecimiento de fracciones de péptidos bioactivos, como las técnicas cromatográficas y las técnicas de membrana. C) La aplicación de nuevos experimentos con animales y ensayos clínicos doble-ciego en humanos para verificar *in vivo* la eficacia de los péptidos antihipertensivos, así como sus efectos a largo plazo una vez administrados por vía oral de forma regular. El mecanismo de acción de los péptidos bioactivos y los efectos adversos asociados a su uso deberían ser cuidadosamente considerados en estos ensayos. Adicionalmente a los aspectos fisiológicos, la biodisponibilidad de los péptidos bioactivos y sus propiedades tecnológicas deberían de ser estudiadas con el objetivo de desarrollar alimentos modelo que contengan estos péptidos y mantengan su actividad durante un periodo de garantía. La interacción de estos péptidos con otros componentes alimentarios, como los hidratos de carbono o los lípidos, así como la influencia de las condiciones del procesado (especialmente el calentamiento) sobre la actividad biológica del péptido

deberían de ser también investigadas. Desde el punto de vista comercial, otros aspectos como la relación coste-eficacia del ingrediente, la facilidad de incorporación a su producto y sus características organolépticas son también de gran importancia. Finalmente, los datos obtenidos de los ensayos clínicos son esenciales para formular rigurosos anuncios de salud y el adecuado etiquetado del producto final que contiene al ingrediente bioactivo.

4. Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado en el marco del Proyecto CYTED XI.24. También se agradece a los Proyectos Consolider 2010 CS-063 y CM-S0505 -AGR-0153 y AGL-2007 065035.

Blanca Hernández-Ledesma disfruta de un contrato post-doctoral Marie-Curie de la Comisión Europea coordinado por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

María del Mar Contreras disfruta de una beca DANONE.

Referencias

- 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.
- Ashar, M. N., Chand, R. (2004). Antihypertensive peptides purified from milks fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*. *Milchwissenschaft*, 59, 14-17.
- Bütikofer, U., Meyer, J., Sieber, R., Wechsler, D. (2007). Quantification of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in hard, semi-hard and soft cheeses. *International Dairy Journal*, 17, 968-975.
- Bütikofer, U., Meyer, J., Sieber, R., Walther, B., Wechsler, D. (2008). Occurrence of the Angiotensin-Converting Enzyme-Inhibiting Tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in Different Cheese Varieties of Swiss Origin. *Journal of Dairy Science*, 91, 29-38.
- Cadee, J. A., Chang, C-Y., Chen, C-W., Huang, C-N., Chen, S-L., Wang, C-K. (2007). Bovine casein hydrolysate (C12 Peptide) reduces blood pressure in prehypertensive subjects. *American Journal of Hypertension*, 20, 1-5.
- Cheung, H-S., Wang, F-L., Ondetti, M. A. Sabo, E. F., Cushman, D. W. (1980). Binding of peptide-substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, 255, 401-407.
- Chobert, J-M., El-Zahar, K., Sitohy, M., Dalgalarroondo, M., Métro, F., Choiset, Y., Haertlé, T. (2005). Angiotensin I-converting-enzyme (ACE)-inhibitory activity tryptic peptides of ovine β -lactoglobulin and of milk yogurts obtained by using different starter. *Lait*, 85, 141-152.
- Degivry, M-C., Alvarez, C., Queguiner, C., Mignot, I., Saint Denis, T. (2007). Novel strains of *Lactobacillus helveticus*. *International patent WO/2007/096497*.
- Fitzgerald, R. J., Murray, B. A., (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal Dairy Technology*, 59, 118-125.
- Garault, P., Pierson, A., Gaye, C., Degivry, M-C., Saint-Denis, T. (2007). Novel strains of *Lactobacillus helveticus*. *International Patent WO/2007/096495*.
- Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F., Addeo, F. (2000). Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiol*, 66, 3898–3904.

- Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M., Recio, I. (2002). Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *International Dairy Journal*, 12, 697-706.
- Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M., Recio, I. (2004a). Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal* 14, 1075-1080.
- Gómez-Ruiz, J. A., Recio, I., Belloque, J. (2004b). ACE inhibitory activity and structural properties of peptide Asp-Lys-Ile-His-Pro [β -CN f(47–51)]. Study of the peptide forms synthesised by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6315–6319.
- Gómez-Ruiz, J. A., Taborda, G., Amigo, L., Recio, I., Ramos, M., (2006). Identification of ACE-inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. *European Food Research Technology*, 223, 595-601.
- Hartmann, R., Meisel, H (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current opinion in Biotechnology*, 18, 163-169.
- Hata, Y., Yamamoto, N., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y., Takano, T. (1996). A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 64, 767-771.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., Recio, I. (2004). Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1504-1510.
- Hernández-Ledesma, B., López-Expósito, I., Ramos, M., Recio, I. (2006). Bioactive peptides from milk proteins. In *Immunochemistry in Dairy Research*, 37-60. Research Signpost ISBN:81-308-0102-7.
- Hernández-Ledesma, B., Miguel, M., Amigo, L., Aleixandre, M. A., Recio, I., (2007a). Effect of simulated gastrointestinal digestion on the anti-hypertensive properties of synthetic β -lactoglobulin peptide sequences. *Journal of Dairy Research*, 74, 336-339.
- Hernández-Ledesma, B., Recio, I., Amigo, L. (2007b). β -lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids*, 35, 257-265.
- Hernández-Ledesma, B., Recio, I., Ramos, M., Amigo, L. (2002). Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *International Dairy Journal*, 12, 805-812.

- Ijäs, H., Collin, M., Finckenberg, P., Pihlanto-Leppälä, A., Korhonen, H., Korpela, R., Vapaatalo, H., Nurminen, M-L. (2004). Antihypertensive opioid-like milk peptide alpha-lactorphin: lack of effect on behavioural tests in mice. *International Dairy Journal*, 14, 201-205.
- Karaki, H., Doi, K., Sugano, S., Uchiwa, H., Sugai, R., Murakami, U., Takemoto, S. (1990). Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology*, 96, 367-371.
- Korhonen, H., Pihlanto, A. (2003). Bioactive peptides: new challenges and opportunities for the dairy industry. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58, 129-134.
- Korhonen, H., Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16, 945–960.
- López-Fandiño, R., Otte, J., van Camp, J. (2006). Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, 16, 1277–1293.
- Maeno, M., Yamamoto, N., Takano, T. (1996). Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 79, 1316-1321.
- Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Kurono, M., Tomizuka, N., Suzuki, H. (1987). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of α -s1-casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51, 2557-2561.
- Masuda, O., Nakamura, Y., Takano, T. (1996). Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutrition*, 126, 3063-3068.
- Miguel, M., Muguerza, B., Sánchez, E., Delgado, M. A., Recio, I., Ramos, M., Aleixandre, M. A. (2005). Changes in arterial blood pressure in caused by long-term intake of milk fermented by *Enterococcus faecalis* CECT 5728. *British Journal of Nutrition*, 93, 1-9.
- Miguel, M., Recio, I., Ramos, M., Delgado, M. A., Aleixandre, M. A. (2006). Antihypertensive effect of peptides obtained from *Enterococcus faecalis*-fermented milk in rats. *Journal of Dairy Science*, 89, 3352-3359.
- Miguel, M., Contreras, M. M., Recio, I., Aleixandre, A. (2009). ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate. *Food Chemistry*, 112, 211-214.

- Mizuno, S., Matsuura, K., Gotou, T., Nishimura, S., Kajimoto, O., Yabune, M., Kajimoto, Y., Yamamoto, N. (2005). Antihypertensive effect of casein hydrolysate in a placebo-controlled study in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. *British Journal of Nutrition*, 94, 84–91.
- Mizuno, S., Nishimura, S., Matsuura, K., Gotou, T., Yamamoto, N., (2004). Release of short and proline-rich antihypertensive peptides from casein hydrolysate with an *Aspergillus oryzae* protease. *Journal of Dairy Science*, 87, 3183-3188.
- Muguerza, B., Ramos, M., Sánchez, E., Manso, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., Delgado, M. A., Recio, I. (2006). Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 16, 61-69.
- 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 β -lactoglobulin. *FEBS Letters*, 402, 99-101.
- Murakami, M., Tonouchi, H., Takahashi, R., Kitazawa, H., Kawai, Y., Negishi, H., Saito, T. (2004). Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (β -lactosin B) isolated from a commercial whey product. *Journal of Dairy Science*, 87, 1967-1974.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., Takano, T. (1995a). Purification and characterization of Angiotensin I-converting enzyme-inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science*, 78, 777-783.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Takano, T. (1995b). Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to Angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Dairy Science*, 78, 1253-1257.
- Nielsen, M. S., Martinussen, T., Flambard, B., Sorensen, K. I., 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.
- Nurminen, M. L., Sipola, M., Kaarto, H., Pihlanto-Leppälä, A., Piilola, K., Korpela, R., Tossavainen, O., Korhonen, H., Vapaatalo, H. (2000). α -lactorphin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Science*, 66, 1535-1543.
- Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T., Korhonen, H. (2000). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: 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.
- Ponstein-Simarro Doorten, A. Y., vd Wiel, J. A. G., Jonker, D. (2009). Safety evaluation of an IPP tripeptide-containing milk protein hydrolysate. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 55-61.
- Pripp, A. H., Isaksson, T., Stepaniak, L., Sorhaug, T. (2004). Quantitative structure-activity relationship modelling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins. *European Food Research and Technology*, 219, 579-583.
- Queguiner, C.; Druesne, A.; Alvarez, C; Pierson, A., Colin, C. (2007). Novel strains of *Lactobacillus helveticus*. *International Patent WO/2007/096498*, European Patent PCT/FR2007/000251.
- Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L., Recio, I. (2005). Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *Journal of Dairy Science*, 88, 3480–3487.
- Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal*, 17, 33–41.
- Quirós, A., Dávalos, A., Lasunción, M. A., Ramos, A., Recio, I. (2008). Bioavailability of the antihypertensive peptide LHLPLP: Transepithelial flux of HLPLP. *International Dairy Journal*, 18, 279-286.
- Recio, I., Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Gómez-Ruiz, J. A., Miguel, M., Amigo, L., López-Expósito, I., Ramos, M., Aleixandre, M. A., Contreras, M. (2006). Péptidos bioactivos identificados en hidrolizados enzimáticos de caseínas lácteas y procedimiento de obtención. *European Patent PCT/ES2006/070079*.
- Robert, M-C., Razaname, A., Mutter, M., Juillerat, M.A. (2004). Peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 6923-6931.
- Ryhänen, E-L., Pihlanto-Leppala, A., Pahkala, E. (2001). A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *International Dairy Journal* 11, 441-447.
- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh, T. (2000). Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, 83, 1434-1440.
- Sano, J., Ohki, K., Higuchi, T., Aihara, K., Mizuno, S., Kajimoto, O., Nakagawa, S., Kajimoto, Y. y Nakamura, Y. (2005). Effect of casein hydrolysate, prepared with

- protease derived from *Aspergillus oryzae*, on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension. *Journal of Medicinal Food*, 8, 423-430.
- Sekiya, S., Kobayashi, Y., Kita, E., Imamura, Y., Toyama, S. (1992). Antihypertensive effects of tryptic hydrolysate of casein on normotensive and hypertensive volunteers. *Journal of the Japanese Society of Nutrition and Food Science*, 45, 513-517.
- Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T., Korpela, R. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 77, 326-330.
- Seppo, L., Keröjoki, O., Suomalainen, T., Korpela, R. (2002). The effect of a *Lactobacillus helveticus* LBK-16 H fermented milk on hypertension-a pilot study on humans. *Milchwissenschaft*, 57, 124-127.
- Sipola, M., Finckenberg, P., Santisteban, J., Korpela, R., Vapaatalo, H., Nurminen, M. L. (2001). Long-term intake of milk peptides attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 52, 745-754.
- Smacchi, E., Gobbetti, M. (1998). Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 687-694.
- Sugai, R. (1998). ACE inhibitors and functional foods. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 336, 17-20.
- Tauzin, J., Miclo, L., Gaillard, J-L. (2002). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α s2-casein. *FEBS Letters*, 531, 369-374.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., Decroos, K., Van Wijmelbeke, L. y Verstraete, W. (2003). The impact of fermentation and in vitro digestion on the formation of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein. *Journal of Dairy Science*, 86, 429-438.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92, 357-366.
- Walsh, D. J., Bernard, H., Murray, B. A., MacDonald, J., Pentzien, A-K., Wright, G. A., Wal, J-M., Struthers, A. D., Meisel, H., FitzGerald, R. J. (2004). In vitro generation and stability of the lactokinin β -lactoglobulin fragment (142-148). *Journal of Dairy Science*, 87, 3845-3857.

- Wu, J., Aluko, R. E., Nakai, S. (2006). Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: Quantitative structure-activity relationship modelling of peptides containing 4-10 amino acid residues. *QSAR & Combinatorial Science*, 25, 873-880.
- Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T. (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 77, 917-922.

Recuperación y revalorización del lactosuero para la producción de nuevos productos con propiedades funcionales.

A.R. Madureira, A.I. Pintado, A. M. Gomes, F. X. Malcata y M. E. Pintado*

CBQF- Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa.

Rua Dr. António Bernardino de Almeida. 4200-072 Porto, Portugal

Tel.: +351 22 5580001 Fax: +351 22 5090351

**E-mail: mmpintado@esb.ucp.pt*

Resumen. En los últimos años han surgido gran cantidad de alimentos funcionales a los que se les atribuyen diversas propiedades beneficiosas. Entre estos alimentos se encuentran aquellos que contienen proteínas del lactosuero así como aquellos que incorporan bacterias probióticas en su composición. En la actualidad existen matrices de proteínas de suero que contienen bacterias probióticas que se mantienen viables durante 28 días a temperaturas de refrigeración. Además, también se han realizado diferentes estudios relacionados con la actividad metabólica, las propiedades antimicrobianas y la resistencia a las enzimas del tracto gastrointestinal. Por último, se ha evaluado el uso de cepas de bacterias del ácido láctico con propiedades probióticas en la producción de exopolisacáridos en lactosuero.

1. Productos lácteos probióticos

El consumo de productos lácteos que contienen cepas probióticas viables ha aumentado considerablemente en los últimos años, en especial debido a las propiedades saludables que se asocian al consumo de este tipo de productos. Esta tendencia ha provocado su diversificación en el mercado mundial. La demanda de estos productos ha sido impulsada principalmente por sus diferentes beneficios, atribuidos en especial a varias bacterias que pertenecen a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, (Lee y Salminen, 1995; Reid, 1999), siempre y cuando puedan

colonizar la parte inferior del intestino. Sin embargo, una condición necesaria (aunque no suficiente) para que se produzca esta colonización es que los mencionados productos contengan al menos 10^7 ufc/ml de bacterias probióticas en el momento de su consumo (FAO, 2001).

Productos lácteos como el yogur (Reuter, 1990; Laroia y Martin, 1991), los helados (Hekmat y McMahon, 1992) y el queso (Gomes y col., 1995, 1998, Stanton y col., 1998) son claros exponentes del éxito de alimentos que contienen microorganismos probióticos. Tipos de queso que hayan sido objeto de investigación en este campo incluyen (en orden cronológico): queso blanco salmuera (Furtado y col., 1993), queso Cheddar (Dinakar y Mistry, 1994; Shaw y White, 1994; Daigle y col., 1997; Gardiner y col., 1998), queso Gouda (Gomes y col., 1995), queso Cottage (Blanchette y col., 1996; Riordan y Fitzgerald, 1998), queso Crescenza (Gobbetti y col., 1998), queso semi-duro de cabra (Gomes y Malcata, 1998) y queso fresco Argentino (Vinderola y col., 2000). Sin embargo, existe una clase de queso sobre la cual se han realizado hasta la fecha muy pocos estudios relacionados con la incorporación de bacterias prebióticas; son los quesos de suero de leche.

1.1. Potencialidad del lactosuero como vehículo para bacterias probióticas.

El suero de leche es la parte acuosa de la leche obtenida tras procesos de coagulación con ácido, calor o cuajo en la producción de queso. Gran parte del volumen mundial de suero de leche se utiliza actualmente para la producción de una gran variedad de productos de elevado valor añadido (descrito en capítulos anteriores). Sin embargo, en Portugal, España y otros países latino americanos el suero de leche sigue siendo eliminado especialmente por las pequeñas industrias lácteas que en conjunto suman importantes volúmenes globales (Pintado y col., 2001). La eliminación de este producto trae consigo no sólo una pérdida importante de

nutrientes, sino también plantea graves problemas para el medio ambiente, debido a su alta demanda biológica y química de oxígeno.

La recuperación de proteínas solubles de suero de leche puede ser utilizada en la producción de queso, lo cual podría ser muy interesante tanto desde el punto de vista nutricional como biológico. El requesón es un queso de suero (similar al queso Ricotta), que se consume normalmente en natural o combinado con sal o azúcar. Se fabrica a través del procesado térmico de suero de leche, lo que conduce a la desnaturalización de las proteínas solubles. La elaboración de requesón supondría un medio adecuado para recuperar las proteínas de suero de leche y una alternativa económica para las pequeñas industrias lecheras (para los que la aplicación de la cromatografía de membrana o de las tecnologías basadas en separación es difícil y costosa). Existen diversos estudios relativos a la optimización de la fabricación y el envasado de este tipo de queso de suero (Pintado y col., 1996; Pintado y Malcata, 2000a, b, c), pero en todos los casos la monitorización de la flora microbiana se limita a microorganismos adventicios y microorganismos contaminantes presentes en el ambiente. Uno de los incentivos para la utilización de suero de leche incluye la incorporación de especies de bacterias probióticas en la elaboración del requesón, lo que podría suponer una ventaja competitiva en términos de marketing. Diferentes estudios para mejorar la viabilidad de las bifidobacterias han demostrado la existencia de una prometedora relación entre cepas probióticas y las proteínas de suero de leche. Marshall y col. (1982) fortificaron leche con proteínas de suero de leche y treonina a fin de proporcionar a las bifidobacterias un medio nutritivo con un bajo potencial redox. Por otra parte, Dave y Shah (1998) estudiaron los efectos de suero de leche en polvo, concentrado de proteínas de suero (CPS) e hidrolizados de caseína ácida (HCA) sobre la viabilidad de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp., *Lactobacillus acidophilus* y bifidobacterias en el yogur.

Tabla 1: Composición proteica del suero de leche (adaptado de Madureira et al., 2007).

Proteína	Concentración (g/L) ^{1,4}	Peso molecular (kDa) ^{2,3}	Número de residuos de aminoácidos ²
β-lactoglobulina	1.3	18,277	162
α-lactoalbúmina	1.2	14,175	123
Albumina sérica	0.4	66,267	582
Imunoglobulinas (A, M & G)	0.7	c. de 150,000	---
Lactoferrina	0.1	80,000	700
Lactoperoxidasa	0.03	70,000	612
Glicomacropéptido	1.2	6,700	64

¹ de Wit (1998), ² Eigel y col. (1984), ³ Brew y col. (1970), ⁴ Korhonen (1995)

Tabla 2. Funciones biológicas de las proteínas de suero lácteo (adaptado de Madureira et al., (2007).

Proteína	Función biológica
Proteínas de suero totales	Prevención de cáncer (cáncer de mama y intestinal; cáncer inducido por químicos); Incremento de la concentración de glutathion (Aumento de la vulnerabilidad de las células tumorales; tratamiento de pacientes con HIV) Actividad antimicrobiana Incremento de la sensación de saciedad (Aumento de aminoácidos en plasma, colecistoquinina y péptidos tipo-glucagon)
β-Lactoglobulina	Transportador (Retinol, Palmitato, Ácidos grasos, Vitamina D y colesterol) Aumento de la actividad de la esterasa pre-gástrica Transferencia de la inmunidad pasiva Regulación del metabolismo del fósforo en las glándulas mamarias
α-Lactalbúmina	Prevención de cáncer Tratamiento de la enfermedad crónica inducida por stress
Albumina sérica bovina	Unión a los ácidos grasos Funciones anti-mutagénicas Prevención de cáncer
Immunoglobulinas	Inmunomodulación (protección de enfermedades por inmunidad pasiva) Actividad antimicrobiana (bacterias y hongos) Actividad opioide

La adición de CPS y HCA mejoró la viabilidad de las bifidobacterias hasta niveles variables debido a la fuente de nitrógeno adicional proporcionada en forma de péptidos y aminoácidos libres. Por último, no hay que olvidar que las proteínas de suero de leche contienen residuos de aminoácidos que son ricos en azufre, el cual, al ser liberado por el calor o tratamiento enzimático contribuye a reducir el potencial redox. Los resultados antes mencionados sugieren que el requesón puede ser un buen sistema de incorporación de bacterias prebióticas, en particular los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

1.2. Propiedades biológicas de las proteínas de suero de leche.

Hipócrates ya proclamó las propiedades saludables del suero en la Antigua Grecia. Durante la Edad Media, el suero de leche se consideró no sólo como un medicamento, sino incluso como un afrodisíaco y un bálsamo para la piel: se trataba de un componente común de pociones y bálsamos para calmar las quemaduras, aumentar la vitalidad y curar diversas enfermedades (Kosikowski, 1982). Las últimas décadas han sido testigos de un creciente interés en los productos de proteína de suero de leche debido a su papel en la nutrición y a su cada vez mayor importancia en la salud humana.

Las proteínas del suero son moléculas globulares con un contenido substancial de α -hélice, en la que los aminoácidos ácido/base e hidrofóbicos/hidrofílicos se distribuyen de una forma bastante equilibrada a lo largo de sus cadenas polipeptídicas (Evans, 1982). La composición proteica del suero de leche, incluyendo el peso molecular y el número de residuos de aminoácidos de cada proteína, se detalla en la Tabla 1. Las proteínas de suero de leche incluyen β -lactoglobulin (β -LG), α -lactoalbúmina (α -LA), inmunoglobulinas (Ig), albúmina sérica bovina (BSA), lactoferrina bovina (BLF) y lactoperoxidasa (LP), así como otros componentes menores. Sus

concentraciones reales dependen del tipo de suero de leche (ácido o dulce), la fuente de leche (bovina, ovina o caprina), la época del año, el tipo de alimento recibido por el animal, la etapa de lactancia y la calidad del tratamiento (Pintado y col., 2001). Sus principales actividades biológicas se resumen en la Tabla 2.

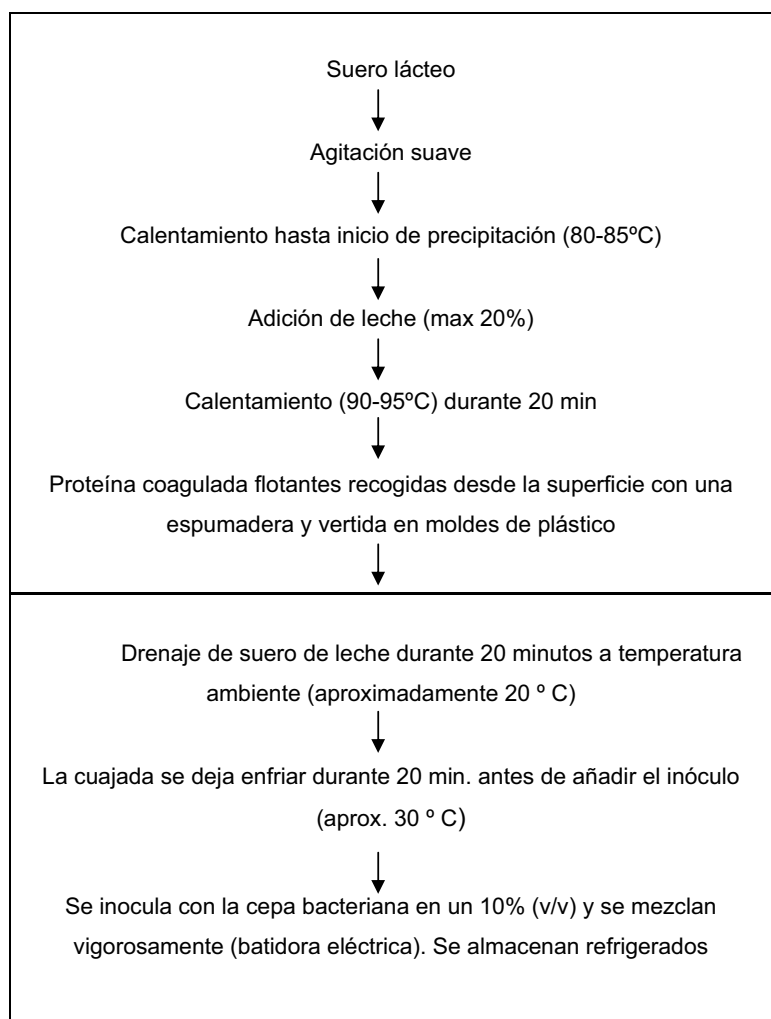


Figura 1. Diagrama esquemático de la producción de matrices de queso de suero con incorporación de cepas probióticas.

2. Incorporación de cepas probióticas a las matrices de queso de suero

2.1. Producción de requesón probiótico

La fabricación experimental de requesón utilizando diferentes tipos de suero y leche se puede realizar utilizando suero obtenido como un subproducto de la fabricación de queso (Madureira y col., 2005). En la Figura 1 se muestra el proceso tradicional de fabricación de requesón. En una primera etapa, se produce la precipitación térmica de las proteínas de suero dulce en tanque de doble pared (100 L) calentado por vapor generado por la quema de gas y con control de la temperatura y la tasa de agitación. En cada lote la cuajada resultante se inocula con la cepa bacteriana de interés en una proporción del 10 % (v/v) (ca. 10^7 ufc/g) pues, como ya se ha comentado anteriormente, el producto probiótico final debe contener al menos 10^7 ufc/g de bacterias probióticas en el momento de su consumo (FAO, 2001).

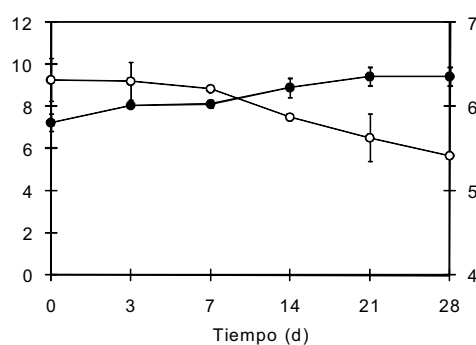
Para mejorar las características organolépticas del producto final se pueden añadir diversos aditivos que darán lugar a matrices dulces (azúcar, aloe vera, fresa y chocolate) o saladas (sal, xantana y hierbas). A continuación, y antes de ser refrigeradas, las matrices se mezclan vigorosamente con la ayuda de una batidora eléctrica para obtener una textura homogénea y suave (Madureira y col., 2008).

2.2. Viabilidad de cepas probióticas en diferentes matrices de requesón

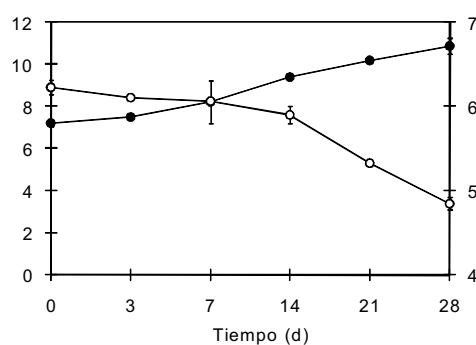
En un primer estudio de investigación la viabilidad de varias cepas de bacterias probióticas (géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) se evaluaron en una matriz de queso de lactosuero mediante la inclusión de aditivos antes de la coagulación de la proteína (Madureira y col., 2005a). La viabilidad de todas las bacterias estudiadas en el requesón a lo largo de 28 días de almacenamiento refrigerado estuvieron, en general, dentro de límites aceptables manteniendo o aumentando su número de células viables (*Lactobacillus. acidophilus* y *Lactobacillus paracasei* cepa *paracasei* LAFTI® L26). En la Figura 2 se representa la viabilidad y el perfil de acidificación de

Lactobacillus paracasei cepa *paracasei* LAFTI® L26 en las matrices de requesón natural, dulce y salado. El tipo de matriz (natural o con el añadido de azúcar o sal) fue

i.



ii.



iii.

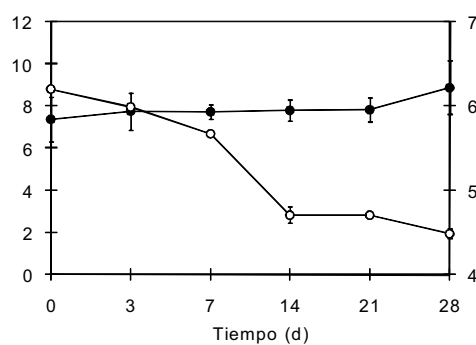


Figura 2 .Valores medios ($\pm$ desviación estándar) del número de células viables (log ufc/g) y la acidificación (como unidades de pH) de *Lactobacillus paracasei* LAFTI® L26 inoculado en queso de suero natural (i), con sal (ii) o con azúcar añadido (iii), y almacenadas a 7 °C durante 28 días (adaptado a partir de los datos de Madureira y col., 2005a).

el factor más importante que afectó a la viabilidad de las cepas bacterianas. Las matrices naturales y con azúcar fueron mejores que las matrices saladas para el crecimiento de *Bifidobacterium animalis* cepa Bo, *Lactobacillus acidophilus* cepa Ki y *Bifidobacterium animalis* cepa LAFTI®B94 (datos no mostrados).

La inclusión de aditivos también produce matrices con mayor producción de ácido láctico. La presencia de aditivos es determinante para la evolución de la proteólisis y la glicólisis, siendo estas dos actividades muy importantes para la textura y aceptación sensorial de las matrices. Como era de esperar, la actividad proteolítica es baja debido a las bajas temperaturas durante el almacenamiento, el corto tiempo de almacenamiento y, sobre todo, a la naturaleza de la matriz ya que las proteínas están menos disponibles para la hidrólisis porque forman una fase separada (sólida) y se encuentran en estado agregado (lo que obstaculiza el acceso a las proteinasas bacterianas). Hay evidencias de que las matrices que sufren menor proteólisis son más firmes (por ejemplo, las matrices con azúcar y chocolate), mientras que las matrices con mayor proteólisis (por ejemplo, con mermelada o con sal) son, a su vez, más suaves, menos adhesivas y más cohesionadas (Madureira y col., 2008).

3. Supervivencia de las bacterias probióticas incorporadas en queso de suero y sometidas a las condiciones que prevalecen en el tracto gastrointestinal

Aunque el lactosuero es una matriz interesante para incorporar cepas probióticas y servir como vector de transmisión, es necesario que las cepas probióticas incorporadas en las matrices de lactosuero sobrevivan el paso por el tracto gastrointestinal y que sean capaces de colonizar el intestino con el fin de asegurar un beneficio al consumidor (Havenaar y col., 1992). Este requisito plantea un importante desafío para las cepas, ya que se enfrentarán a las condiciones adversas del jugo gástrico, las enzimas digestivas y de las sales biliares.

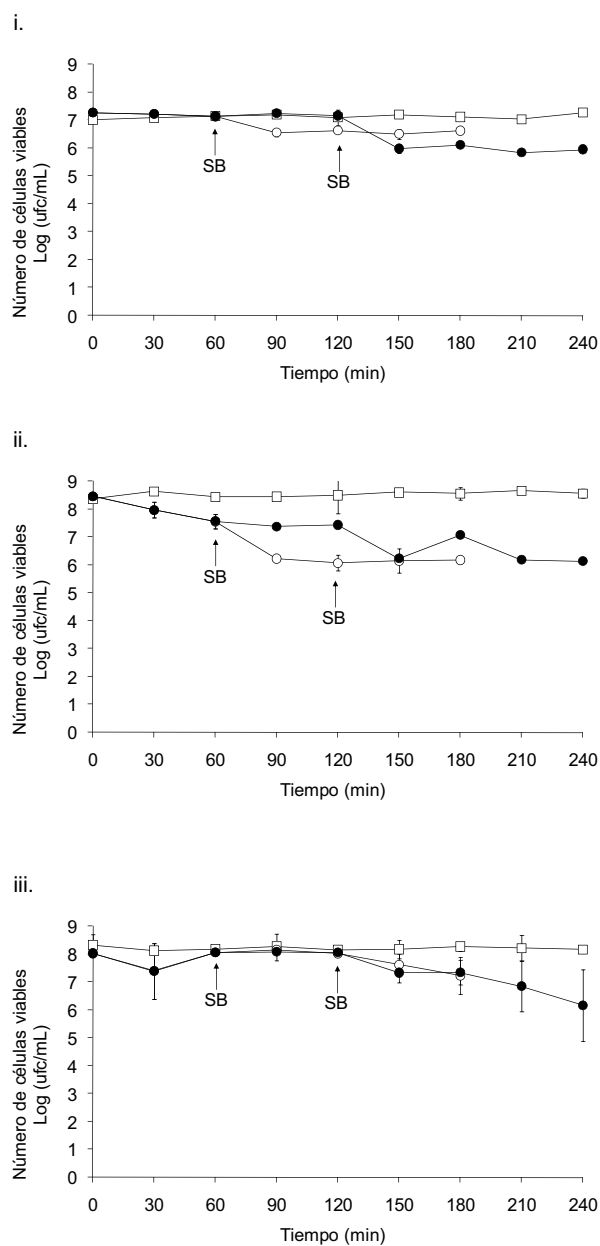


Figura 3. Valores medios ($\pm$ desviación estándar) del número de células viables (log ufc/g) de (i) *Bifidobacterium animalis* cepa Bo, (ii) *Bifidobacterium animalis* cepa Bb-12 y (iii) *Lactococcus brevis* cepa LMG 6906 cuando se exponen durante 60 minutos a jugo gástrico artificial y 120 minutos a 0,3% sales biliares ($\circ$), durante 120 minutos a jugo gástrico artificial y 120 minutos a 0,3% sales biliares ($\bullet$). Muestras control realizadas a 240 minutos ($\square$) (adaptado de Madureira y col. 2005b).

Recientemente se ha estudiado la supervivencia de cepas de *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *B. animalis* y *L. brevis* en queso de suero modelo exponiéndolas a las condiciones que normalmente se encuentran en el tracto gastrointestinal: exposición al jugo gástrico simulado (con un pH bajo y pepsina) seguido por la adición de sales biliares (Madureira y col., 2005b).

La resistencia de las cepas probióticas a su paso por el tracto gastrointestinal cuando se encuentran integradas en una matriz de queso de suero es, al parecer, dependiente de cada cepa. Los mejores perfiles de viabilidad a lo largo de todo el período de exposición a la combinación de jugo gástrico artificial y sales biliares se registraron para *L. brevis*, *B. animalis* cepa Bo y *B. animalis* cepa Bb-12 (Figura 3). *L. acidophilus* LAFTI®L10 y *L. acidophilus* cepa Ki resistieron la exposición al jugo gástrico artificial, pero revelaron diferentes comportamientos en presencia de sales biliares ya que la disminución del número de células viables puede comprometer su viabilidad. *L. paracasei* LAFTI®L26 y *B. animalis* LAFTI®B94 fueron los menos resistentes a los jugos gástricos artificiales.

Varios parámetros pueden determinar la supervivencia de las cepas probióticas a su paso por el tracto gastrointestinal superior: el grado de acidez del estómago y el período de exposición así como la concentración de sales biliares y el período de exposición a ellas. Sin embargo, para confirmar todos estos resultados obtenidos en estudios *in vitro* son necesarios estudios *in vivo* que permitan el análisis microbiológico de las heces después de la ingestión de alimentos inoculados con las cepas en estudio.

4. Incorporación de bacterias probióticas en el queso de suero para el control de la contaminación. Incremento de la seguridad microbiológica

Además del control que se ejerce sobre la microflora intestinal a través de la colonización de la parte inferior del intestino por parte de las bacterias probióticas,

resulta también de gran interés la actividad antimicrobiana frente a patógenos transmitidos por los alimentos y a bacterias contaminantes presentes en ellos. Las bifidobacterias son capaces de: (i) producir ácidos orgánicos, los cuales a través de un descenso de pH pueden inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, (ii) producir peróxido de hidrógeno el cual posee también propiedades antimicrobianas, y (iii) sintetizar bacteriocinas u otros compuestos de defensa que pueden inducir respuestas inmunológicas deseadas (Velraeds y col., 1996). Estudios *in vitro* han demostrado que *Lactobacillus* spp. poseen actividad inhibitoria frente a microorganismos como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. (de Vuyst y col., 2004), mientras que *Bifidobacterium* spp. son activas frente a *Listeria monocytogenes* (Bevilacqua y col., 2003).

Los patógenos presentes en los alimentos se han considerado responsables de un gran número de enfermedades ocasionadas por el consumo de productos lácteos frescos, especialmente en países del sur de Europa. El hecho que los quesos de suero fresco de leche posean un pH y un contenido de humedad relativamente elevado, además de un relativamente bajo contenido de sal, les hace particularmente susceptibles a la descomposición microbiana. Este deterioro es impulsado principalmente por mohos y levaduras, así como por miembros de los géneros bacterianos *Pseudomonas* y *Staphylococcus* y bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (Pintado y Malcata, 2000a, b).

En los intentos de elaborar un queso de suero de leche que sea más seguro para el consumo humano la actividad antimicrobiana de las bacterias probióticas puede ser aprovechada. Por tanto, se hacen necesarios más estudios con el fin de evaluar el grado de protección que podrían ofrecer estos microorganismos.

La actividad antimicrobiana de *L. acidophilus* LAFTI®L10 y *B. animalis* LAFTI®B94, frente a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* inoculadas a tres diferentes

niveles, (10^3 - 10^4 , 10^4 - 10^6 y 10^6 - 10^8 ufc/g) ha sido recientemente evaluada (Madureira y col., resultados no publicados) (ver Figura 4). En general, se observa una mayor

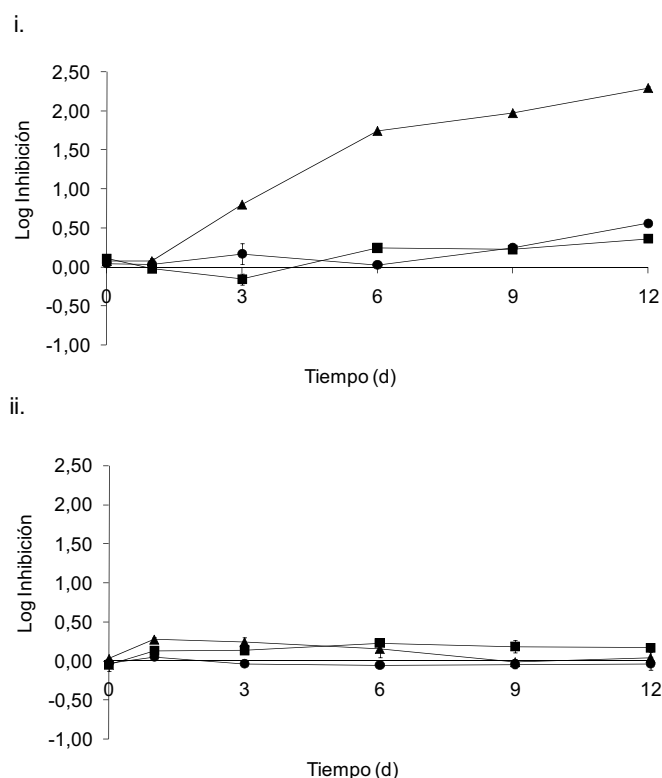


Figura 4. Evolución de la inhibición (log) $\pm$ desviación estándar para i), *Pseudomonas aeruginosa* y ii) *Listeria monocytogenes* inoculadas a los niveles 10^6 - 10^8 ufc/g (●), 10^4 - 10^6 ufc/g (■) y 10^3 - 10^4 ufc/g (▲) de *Bifidobacterium animalis* LAFTI® B94 (Madureira y col., resultados no publicados).

inhibición de patógenos y bacterias contaminantes de los alimentos por parte de *B. animalis* que por parte de *L. acidophilus*. Sin embargo, tales propiedades sólo se observan cuando el inóculo se realiza al nivel más bajo, ya que a los niveles más altos de inóculo *L. acidophilus* provocó una mayor inhibición. Concretamente, la mayor inhibición por parte de *B. animalis* se observó frente a *P. aeruginosa* a los tres niveles de inóculo. Asimismo, la menor inhibición se detectó frente a *L. monocytogenes* con el inóculo más alto, frente a *E. coli* con el inóculo a nivel intermedio y frente a *L.*

monocytogenes con el nivel de inóculo más bajo. La inhibición más significativa de *L. acidophilus* se observó frente a *L. monocytogenes* con el inóculo más alto, frente a *S. aureus* con el inóculo a nivel intermedio y frente a *S. enteritidis* con el inóculo más bajo.

5. Exopolisacáridos producidos por *Lactobacillus acidophilus*

Las bacterias del ácido láctico (LAB) se utilizan en la industria alimentaria para la fabricación de varios productos fermentados. En la industria láctea, las LAB son ampliamente empleadas debido a la capacidad de ciertas cepas para mejorar el sabor y la textura de los productos lácteos. Algunas LAB, además de ser consideradas microorganismos probióticos, producen exopolisacáridos (EPS) que o bien excretan al medio de cultivo (goma) o permanecen unidos a la pared celular bacteriana formando de esta manera el EPS capsular (Sutherland, 1972). El interés en los EPS ha aumentado significativamente en los últimos años debido a su utilización como aditivos en una amplia variedad de productos alimenticios donde actúan como espesantes, estabilizantes, emulsionantes o gelificantes (Kimmel y col., 1998). Además de los beneficios tecnológicos, algunos EPS producidos por las LAB han demostrado efectos fisiológicos beneficiosos en el consumidor. Se ha especulado que el aumento de la viscosidad de los alimentos que contienen EPS provoca un mayor tiempo de residencia del alimento en el tracto gastrointestinal, lo cual podría favorecer su colonización por parte de las bacterias probióticas (German y col., 1999; Kaur y col., 2002; Ouwehand y col., 2002). Entre los efectos fisiológicos beneficiosos para la salud humana destacan la capacidad para disminuir los niveles de colesterol, la actividad anticancerígena, inmunomodulatoria, antitumoral y sus efectos prebióticos (Harris y Ferguson, 1993; Cummings y Englyst, 1995; Kitazawa y col., 1998; Chabot y col., 2001; Dal Bello y col., 2001; Korakli y col., 2002; Pigeon y col., 2002).

En los estudios de la producción de EPS por parte de las LAB se utilizan en muchos casos medios tan complejos como los de Man Rogosa y Sharpe (MRS), All Purpose Tween (ATP) y medios sintéticos (de leche enriquecida por ultrafiltración o suero de queso). La composición del medio de cultivo es un factor muy importante en la producción de EPS, y algunos nutrientes complejos del medio (por ejemplo, extracto de carne, peptona y extracto de levadura) pueden interferir en el análisis de sus monómeros y su estructura (Degeest y col., 2001; Kimmel, 1998a; Laws y col., 2001).

6. El crecimiento bacteriano y la producción de exopolisacáridos

La cepa, su condición y el medio de cultivo empleado influyen en la composición y cantidad de EPS producido por una determinada especie. En particular, la fuente de hidrato de carbono desempeña un papel importante en la cantidad de EPS producido y también puede afectar a la propia composición del EPS (Looijesteijn y col., 1999). Los EPS son normalmente producidos a niveles de 10-1000 mg/L y se caracterizan por su elevado peso molecular (por encima de 10^6 Da) (Duboc y Mollet, 2001). La biosíntesis y secreción del EPS por parte de las LAB se realiza durante diferentes fases del crecimiento y la cantidad y el tipo de polímero está influenciado por las condiciones de crecimiento. Se ha evaluado la capacidad de producción de EPS de dos cepas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus* LAFTI®L10 y *L. acidophilus* ATTC 4356) utilizando como medio de fermentación MRS con 20 g/L de lactosa y suero de leche. Las diversas fracciones del EPS (EPS1 y EPS2) y el sobrenadante (SP1 y SP2) (normalmente rechazados) se analizaron con el fin de evaluar las posibles interferencias durante la purificación del EPS (Degeest y De Vuyst, 1999). El método empleado es capaz de distinguir entre dos fracciones de EPS, una de alto peso molecular y otra de bajo peso molecular.

Tabla 3- Crecimiento bacteriano, producción total de EPS, EPS en masa seca (EPS1 y EPS2) y concentración de proteínas totales obtenidos a partir de un cultivo de *L. acidophilus* LAFTI® L10 en MRS suplementado con lactosa.

Tiempo (h)	DO 650	Log (ufc/mL) ±SD ^e	EPS1 ^a (mg /L) ±SD ^e	EPS2 ^b (mg/L) ±SD ^e	EPS1 masa ^c (mg/g) ±SD ^e	EPS2 Masa seca ^d (mg/L) ±SD ^e	Proteína en EPS1 (mg/L)	Proteína en EPS2 (mg/L)
0	0.3	7.09±0.10	297±7	118±12	3.5±0.1	2.5±0.1	169	128
6	0.86	8.36±0.01	343±35	153±26	4.0±0.2	2.3±0.1	247	32
24	5.41	8.43±0.02	265±18	116±20	3.6±0.2	0.7±0.0	158	22

^aEPS 1= Exopolisacárido después de la primera precipitación con etanol; ^bEPS 2= Exopolisacárido después de la segunda precipitación con etanol; ^cEPS 1= Exopolisacárido masa seca después de la primera precipitación con etanol; ^dEPS 2= Exopolisacárido masa seca después de la segunda precipitación con etanol; ^eSD= Desviación estándar (n=2); DO = Densidad óptica.

Table 4- Crecimiento bacteriano, producción total de EPS, EPS en masa seca (EPS1 y EPS2) y concentración de proteínas totales obtenidos a partir de un cultivo de *L. acidophilus* ATCC 4356 en MRS suplementado con lactosa.

Tiempo (h)	DO 650	Log (ufc/mL) ±SD ^e	EPS1 ^a (mg /L) ±SD ^e	EPS2 ^b (mg/L) ±SD ^e	EPS1 masa ^c (mg/g) ±SD ^e	EPS2 Masa seca ^d (mg/L) ±SD ^e	Proteína en EPS1 (mg/L)	Proteína en EPS2 (mg/L)
0	0.22	7.57±0.00	292±2	114±8	3.6±0.5	2.8±0.3	192	22
6	1.29	8.59±0.04	336±12	141±7	3.9±0.5	2.5±0.1	220	22
24	3.64	8.67±0.04	316±7	118±16	3.8±0.5	0.4±0.9	215	51

^aEPS 1= Exopolisacárido después de la primera precipitación con etanol; ^bEPS 2= Exopolisacárido después de la segunda precipitación con etanol; ^cEPS 1= Exopolisacárido masa seca después de la primera precipitación con etanol; ^dEPS 2= Exopolisacárido masa seca después de la segunda precipitación con etanol; ^eSD= Desviación estándar (n=2); DO = Densidad óptica.

Estudios realizados con las mismas cepas a las 24 h de fermentación (Pintado y col., 2005), revelaron que las características de productividad del EPS fueron similares (Tabla 3 y 4). Sin embargo, la cantidad de EPS disminuyó con el grado de purificación como se esperaba. Los niveles de EPS1 a las 24 horas fueron 265 mg/mL y 316 mg/L y 116 mg/L y 118 mg/L para EPS2 para *L. acidophilus* LAFTI[®]L10 y *L. acidophilus* ATCC 4356, respectivamente. Esta reducción puede explicarse debido a la pérdida de EPS1 que no es totalmente precipitado en la segunda fase de precipitación y por lo tanto se mantiene en el sobrenadante SP2, o debido a que los “pellets” de EPS se pierden fácilmente durante el proceso de purificación. El nivel máximo de EPS se observó a las 6 horas de fermentación, mientras hubo una reducción en el nivel de EPS al final del período de incubación. La reducción en la producción de EPS puede ser debido a la degradación enzimática (actividad de glicohidrolasas que progresivamente destruyen el polímero), el cambio en los parámetros físicos del medio de cultivo o modificaciones reversibles de ADN que resultan en diferentes tipos de células con capacidad para producir diferentes tipos de EPS (Cerning y col., 1988; Gancel y Novel, 1994; De Vuyst y col., 1998; Pham y col., 2000).

Estos resultados indican que los ingredientes complejos del medio MRS o del suero pueden interferir en la cuantificación del EPS como anteriormente habían sugerido Kimmel y Roberts (1998). Ambas cepas crecieron bien en los medios de cultivo, con perfiles de crecimiento similares durante las 24 h (Figura 5). Estos valores son del mismo orden de magnitud que los descritos en otros trabajos utilizando *L. acidophilus* LAFTI[®]L10 (Pintado y col., 2003 y 2004), que revelaron que la fase estacionaria de crecimiento se produce entre las 12 h y las 24 h y que en el mismo período la producción de EPS es máxima.

El principal azúcar que se convierte en ácido láctico es la glucosa. Este azúcar se transforma en ácido láctico por la vía glicolítica homofermentativa pasando de 18 g/L al inicio de la fermentación a 6 g/L a las 24 h en el caso de *L. acidophilus* LAFTI[®]L10, y

de 18 g/L a 8 g/L para *L. acidophilus* ATCC4356. La lactosa (18 g/L) sólo se consumió cuando los niveles de glucosa fueron muy bajos para ambas cepas (Figura 5). El contenido de ácido láctico obtenido a las 24 h fue muy alto, 18 g/L para *L. acidophilus* LAFTI® L10 y 12 g/L para *L. acidophilus* ATCC4356. Cuando se analizó el medio de

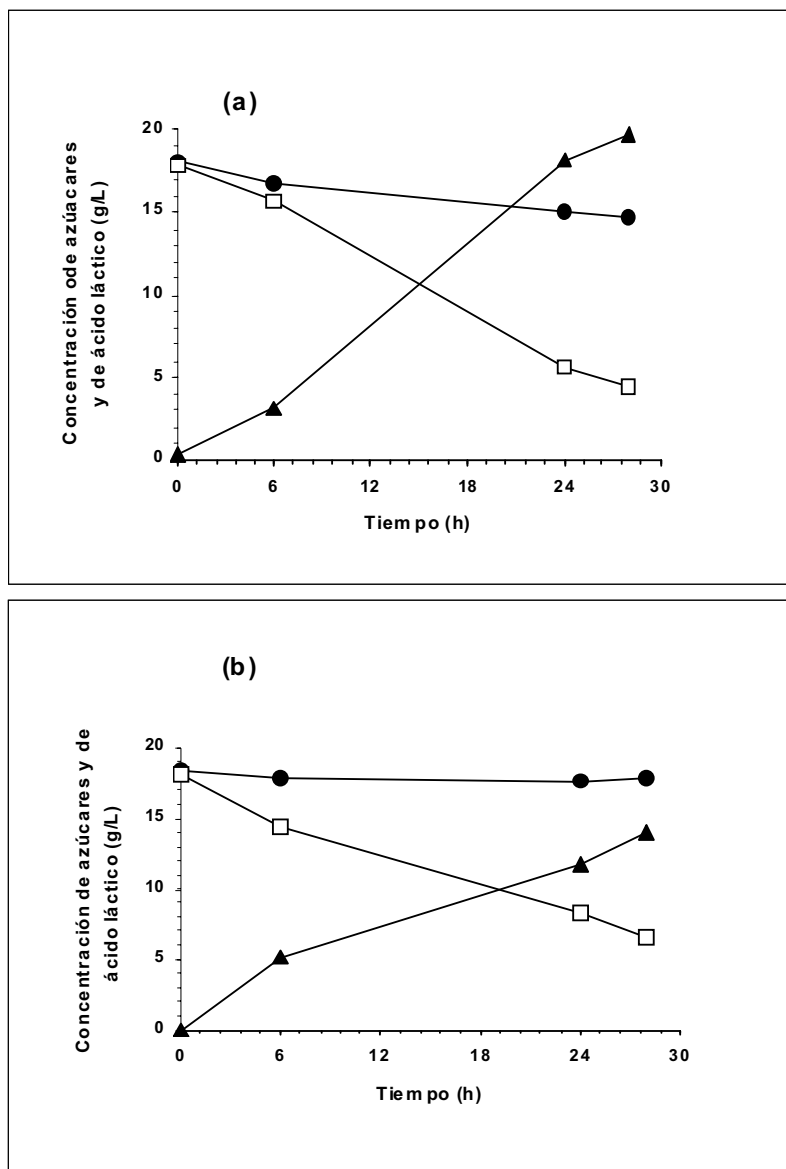


Figura 5. Consumo/producción de lactosa (?), glucosa (?) y ácido láctico (?) en un cultivo de (a) *L. acidophilus* LAFTI® L10 y (b) *Lb. acidophilus* ATCC 4356.

fermentación no se encontraron otros ácidos (ácido cítrico, ácido fórmico, ácido succínico o ácido acético).

En la literatura se pueden encontrar importantes diferencias cuando se cuantifican los EPS incluso para las mismas cepas. Esta divergencia probablemente se debe a los diferentes medios elegidos para la producción de EPS, las diferentes técnicas de aislamiento empleadas, los métodos utilizados para la cuantificación y el grado de pureza obtenido (Ruas-Madiedo y de Los Reyes-Gavilán, 2005; Behare y col., 2009). La cantidad de EPS lácteos (0,1-5 g/L) producidos por las LAB son limitados en comparación con la producción de goma xantana (30-50 g/L) (Degeest y col., 2001). Aunque muy bajas concentraciones deberían ser suficientes para detectar los beneficios de la EPS en los alimentos, la producción de EPS podría mejorarse a través de la manipulación genética. Esta técnica se emplearía para modificar las actividades de cualquiera de las enzimas que intervienen en la biosíntesis o para controlar la fisiología microbiana (Laws y col., 2001). El uso de suero de leche como medio de fermentación presenta la oportunidad de crear productos con un valor añadido. La utilización de suero de leche o permeado de suero de leche como medio de fermentación reduciría su contenido en lactosa, lo que implicaría una disminución de la demanda biológica de oxígeno (BDO) así como una reducción del coste de eliminación (Kilara y Patel, 1992).

El EPS producido *in situ* por las LAB incorporadas en productos con suero de leche podría resultar en un producto final seguro y natural, con la ventaja de la revalorización de este subproducto. Estos EPS podrían tener un impacto importante en el desarrollo de nuevos productos alimenticios (tanto fermentados como no fermentados), especialmente para mejorar su textura, su estabilidad y su capacidad de retención de agua, además de las propiedades saludables que estos EPS pudieran tener.

Conclusiones y perspectivas futuras

Las matrices de lactosuero son buenos vehículos para aquellas especies de bacterias probióticas en donde se han obtenidos buenos perfiles de viabilidad para un determinado número de cepas. El uso de tales cepas también aumenta la vida útil de este producto debido a la posible inhibición de la contaminación microbiana. El producto final es un producto bi-funcional ya que contiene proteínas de suero de leche y bacterias probióticas, ambas con funciones biológicas ya demostradas. En general, se ha observado que las cepas bacterianas consiguen sobrevivir procesos de simulación de las condiciones gastrointestinales. Sin embargo, aún son necesarios estudios *in vivo* para confirmar los resultados obtenidos en los estudios *in vitro*.

Los quesos de suero con microorganismos probióticos presentan una elevada viabilidad de las cepas y un alto contenido en ácido láctico producido por estas bacterias. Sin embargo, la elevada presencia de ácido se considera negativa desde un punto de vista sensorial y se tienen que buscar diferentes mecanismos para disminuir su concentración. Una de las formas podría ser el encapsulamiento de las cepas utilizando también proteínas de suero de leche, lo que mantendría los microorganismos probióticos viables y en número necesario pero sin actividad metabólica, protegiendo las características organolépticas del producto.

La incorporación directa de EPS en distintos productos lácteos o su producción *in situ*, utilizando cepas de LAB como *L. acidophilus* tiene una influencia positiva en la funcionalidad y propiedades biológicas de estos productos. La producción de EPS por LAB probióticas tiene un enorme potencial como cultivos funcionales que podrían sustituir a muchos de los aditivos comerciales actualmente en uso.

Referencias

- Behare, P. V., Rameshwar, S., Kumar, M., Prajapati, J. B., Singh, R. P. 2009. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: A review. *Journal of Food Science and Technology* 46: 1-11.
- Bevilacqua, L., Ovidi, M., di Mattia, E., Trovatielli, L. D., Canganella, F. 2003. Screening of *Bifidobacterium* strains isolated from human faeces for antagonist activities against potential bacterial pathogens. *Microbiology Research* 158: 179-185.
- Blanchette, L., Roy, D., Bélanger, G., Gauthier, S.F. 1996. Production of cottage cheese using dressing fermented by *Bifidobacteria*. *Journal of Dairy Science* 79: 8-15.
- Brew, K., Castellino, F. J., Vanaman, T. C. and Hill, R. L. 1970. The complete amino acid sequence of bovine α -lactalbumin. *Journal of Biological Chemistry* 10: 4570-4582.
- Chabot, S., Yu, H. L., De Leseleuc, L., Cloutier, D., van Calsteren, M. R., Lessard, M., Roy, D., Lacroix, M., Oth, D. 2001. Exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* RQ-595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN-g in mouse splenocytes. *Lait* 81: 683-697.
- Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M. J., Landom, M. 1988. Exocellular polysaccharides production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnology. Letters* 10: 255.
- Cummings, J. H., Englyst, H. N. G. 1995. Gastrointestinal effects of food carbohydrate. *American Journal of Clinical Nutrition* 61: 938S-945S.
- Dal Bello, F. D., Walter, J., Hertel, C., Hammes, W. P. 2001. In vitro study of probiotic properties of levan-type exopolysaccharides from *Lactobacilli* and nondigestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. *System Applied Microbiology* 24: 232-237
- Daigle, A., Roy, D., Bélanger, G., Vuilleumard, J. C. 1997. Production of hard-pressed cheese (Cheddar cheese-like) using cream fermented by *Bifidobacterium infantis* ATCC 27920 G. (Abstr.) *Journal of Dairy Science* 80 (Sup. 1):103.
- Dave, R. I., Shah, N. P. 1998. Ingredients supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yoghurt. *Journal of Dairy Science* 81: 2804-16.
- De Vuyst, L., Makras, L., Avonts, L., Holo, H., Yi, Q., Servin, A., Fayol-Messaoudi, D., Berger, C., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., Sgouras, D., Martinez-Gonzales, B., Panayotopoulou, E., Mentis, A., Smarandache, D., Savu, L., Thonart, P., Nes, I.

2004. Antimicrobial potential of probiotic or potentially probiotic lactic acid bacteria, the first results of the international European research project PROPATH of the PROEUHEALTH cluster. *Microbiology Ecology Health Disease* 16: 125-130.
- De Vuyst, L., Vanderveken, F., van de Ven, S., Degeest, B. 1998. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology* 84: 1059-1068.
- De Wit, J. N. 1998. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science* 81: 597-602.
- Degeest, B., De Vuyst, L. 1999. Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2863-2870.
- Degeest, B., Vanningelge M., F., Laws, A., De Vuyst, L. 2001 UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase activity indicates the presence of N-acetylgalactosamine in exopolysaccharides of *Streptococcus thermophilus* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3976–3984.
- Dinakar, P., Mistry V. V. 1994. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 77:2854-2864.
- Duboc, P., Mollet, B. 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal* 11: 759-768.
- Eigel, W. N., Butler, J. E., Ernstrom, C. A., Farrell, H. M., Harwalkar, V. R., Jenness, R. Whitney, R. M. 1984. Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision. *Journal of Dairy Science* 67: 1599-1631.
- Evans, E. W. 1982. Uses of milk proteins in formulated foods. In B. J. F. Hudson, *Developments in Food Proteins*. London: Applied Science.
- FAO, 2001. Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. *Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001 [cited 2005 Dec 15]. Available from: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf.
- Furtado, M. M., Partridge, J. A., Ustunol, Z. 1993. Ripening characteristics of reduced fat cheddar cheese using heat-shocked and live *Lactobacillus casei* as adjunct culture. (Abstr) *Journal of Dairy Science* 76 (Sup.1):101.

- Gancel, F., Novel, G. 1994. Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 2. Distinct modes of polymer production and degradation among clonal variants. *Journal. Dairy Science* 77: 689-695.
- Gardiner, G., Ross, R. P., Collins, J. K., Fitzgerald, G., Stanton, C. 1998. Development of a probiotic Cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 64:2192-2199.
- German, B., Schiffrin, E., Reniero, R., Mollet, B., Pfeifer, A., Neeser, J. R. 1999. The development of functional foods: Lessons from the gut. *Trends in Biotechnology*, 17: 492–499.
- Gobbetti, M., Corsetti, A., Smacchi, E., Zocchetti, A., de Angelkis, M. 1998. Production of Crescenza cheese by incorporation of *Bifidobacteria*. *Journal of Dairy Science* 81:37-47.
- Gomes, A. M. P., Malcata, F. X., Klaver, F. A. M., Grande, H. G. 1995. Incorporation and survival of *Bifidobacterium* sp. strain Bo and *Lactobacillus acidophilus* strain Ki in a cheese product. *Netherlands Milk Dairy Journal* 49:71-95.
- Gomes, A. M. P., Malcata, F.X. 1998. Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. *Journal of Dairy Science* 81:1492-1507.
- Harris, P. J., Ferguson, L. R. 1993. Dietary fibre: Its composition and role in protection against colorectal cancer. *Mutation Research*, 290: 97–110.
- Havenaar, R., Brink, B. T., & Huis in't Veld, J. H. J. 1992. Selection of strains for probiotic use. In *Probiotics* (pp. 209-224). London: R. Fuller, ed. Chapman & Hall.
- Hekmat, S., McMahon, D. J. 1992. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. *Journal of Dairy Science* 75:1415-22.
- Kaur, P. I., Chopra, K. Saini, A., 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Science* 15: 1-9
- Kilara, A., Patel, M. T. 1992. *Whey and lactose fermentation. Whey and Lactose Processing*. Zadow J. G. Editor, Elsevier Applied Science, London, 409–448.
- Kimmel, S. Roberts, R. F. 1998a. Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR. *International Journal of Food Microbiology* 40: 87-92.
- Kimmel, S. A., Roberts, R. F., Ziegler, G. R. 1998b. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium: *Applied and Environmental Microbiology* 64: 659-664.

- Kitazawa, H., Harata, T., Uemura, J., Saito T., Kaneko, T., Itoh, T. 1998. Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *International Journal of Food Microbiology* 40:169-175.
- Korakli, M., Rossmann, A., Ganzle, M. G., Vogel, R. F. 2002. Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Journal of Applied Microbiology* 92:958-965.
- Korhonen, H. 1995. Whey as raw material for development of new products for human nutrition and health, a review. In *Proceedings of NIF/NMR – seminar no. 252*, Turku, Finland, 13-15, 1, NJF – report 102, pp. 207-219.
- Kosikowski, F. V. 1982. Whey and whey foods. In Kosikowski, F. V. (ed.), *Cheese and Fermented Milk Foods*. New York, Edwards Brothers, pp. 446-469.
- Laroia, S., Martin J. H. 1991. Effect of pH on the survival of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in frozen fermented dairy desserts. *Culture Dairy Production Journal* 26:13-21.
- Laws, A. P., Gu Y., Marshall, V. M. 2001. Biosynthesis, characterization, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria, *Biotechnology Advances* 19:597–625.
- Lee, Y. K., Salminen, S. 1995. The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science and Technology* 6:241-245.
- Looijesteijn, P. J., Boels, I. C., Kleerebezem, M., Hugenholtz, J. 1999. Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by the sugar source. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5003-5008.
- Madureira, A. R., Gião, M. S., Pintado, M. E., Gomes, A. M. P., Freitas, A. C., Malcata, F. X. 2005a. Incorporation and survival of probiotic bacteria in whey cheese matrices. *Journal of Food Science* 70 (3), M160-165.
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Truszkowska, K., Pintado, M. E., Gomes, A. M. P., Malcata, F. X. 2005b. Survival of Probiotic Bacteria in a Whey Cheese Vector Submitted to Environmental Conditions Prevailing in the Gastrointestinal Tract. *International Dairy Journal* 15:921-927.
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Pintado, M. E., Gomes, A. M. P. & Malcata, F. X. 2007. Bovine whey proteins – overview on the main biological activities. *Food Research International* 40:1197-1211.

- Madureira, A. R., Soares, J. C., Freitas, A. C., Pintado, M. E., Gomes, A. M. P., Malcata, F. X. 2008. Sweet whey cheese matrices inoculated with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* LAFTI®L26. *Le lait*, 88:649-665.
- Marshall, V. M., Cole, W. M., Mabbitt, L. A. 1982. Fermentation of specially formulated milk with single strains of *Bifidobacteria*. *Journal of Dairy Technology* 35:143-144.
- Ouwehand, A. C., Lagström H., Suomalainen T., Salminen, S. 2002. Effect of Probiotics on Constipation, Fecal Azoreductase Activity and Fecal Mucin Content in the Elderly. *Annual Nutrition Metabolics* 46:159-162.
- Pigeon R. M., Cuesta E. P., Gilliland S. E. 2002. Binding of free bile acids by cells of yoghurt starter culture bacteria. *Journal Dairy Science* 85:2705-2710.
- Pham, P. L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G., Cerning, J. 2000. Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Applied Environmental Microbiology* 67: 33-41.
- Pintado, M. E., Lopes da Silva, J. A., Malcata F. X. 1996. Characterisation of Requeijão and technological optimisation of its manufacturing process. *Journal of Food Engineering* 30:363-376.
- Pintado, M. E., Malcata, F. X. 2000a. Characterisation of whey cheese packaged under vacuum. *Journal Food Protection* 63:216-21.
- Pintado, M. E., Malcata, FX. 2000b. Optimisation of modified atmosphere packaging with respect to physicochemical characteristics of Requeijão. *Food Research International* 33:821-832.
- Pintado, M. E., Malcata, F. X. 2000c. The effect of modified atmosphere packaging on the microbial ecology in Requeijão, a Portuguese whey cheese. *Journal of Food Processing and Preservation* 24:107-124.
- Pintado, M. E., Macedo, A. C., Malcata, F. X. 2001. Review: technology, chemistry and microbiology of whey cheeses. *Food Science and Technology International* 7:105-116.
- Pintado, A. I. E., Barbosa, C. C. R., Pintado, M. E., Gomes, A. M. P., Malcata, F. X. 2003. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus acidophilus* grown in a semi-defined medium. Poster presentation Micro'2003, Tomar, 29th November - 2nd December, Portugal.
- Pintado M. E., Gomes A. M. P., Malcata, F. X. 2004. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus acidophilus* for potential applications in fresh cheese, Poster

- presentation, IDF 2004 — *Symposium on Cheese: Ripening, Characterization & Technology*, Prague, de 21-25th March, Chec Republic.
- Pintado, A. I. E., Pintado, M. E., Gomes, A. M. P., Malcata, F. X. 2005 Evaluation of isolation method of Exopolysaccharide produced by *Lactobacillus acidophilus*. Poster presentation 7º Encontro de Química dos Alimentos, Viseu, 13-16 th April, Portugal.
- Reid G., 1999. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Applied Environmental Microbiology* 65:3763-3766.
- Reuter G., 1990. Bifidobacteria cultures as components of yoghurt-like products. *Bifidobacteria Microflora* 9:107-118.
- Riordan, K. O., Fitzgerald, F. 1998. Evaluation of *Bifidobacteria* for the production of antimicrobial compounds and assessment of performance in cottage cheese at refrigeration temperature. *Journal of Applied Microbiology* 85:103-114.
- Ruas-Madiedo, P., de los Reyes-Gavilan, C. G. 2005. Invited review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 88:843-856.
- Shaw, S. K., White, C. H. 1994. Survival of *Bifidobacteria* in reduced fat Cheddar cheese (Abstr). *Journal of Dairy Science* 77(Sup 1):4.
- Stanton, C., Gardiner, G., Lynch, P. B., Collins, J. K., Fitzgerald, G., Ross, R. P. 1998. Probiotic cheese. *International Dairy Journal* 8:491-496.
- Sutherland, I. W. 1972. Bacterial exopolysaccharides. *Advances in Microbiology and Physiology* 8: 143-213.
- Velraeds, M. C., van der Mei, H. C., Reid, G., Busscher, H. J. 1996. Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1958-1963.
- Vinderola, C. G., Prosello, W., Gilberto, D., Reinheimer, J. A. 2000. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinean Fresco cheese. *Journal of Dairy Science* 83:1905-1111.

Componentes de la soja como ingredientes funcionales en lácteos.

M. D. del Castillo Bilbao, Miryam Amigo-Benavent y José Manuel Silván Jiménez.

Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC)

C/Juan de la Cierva 3, 28006, Madrid (España); www.ifi.csic.es

Tel: 91 562 29 00; fax: 91 564 48 53; delcastillo@ifi.csic.es

1. Introducción

La soja (*Glycine max*) es una de las fuentes naturales más importantes de ingredientes funcionales. A esta legumbre se le atribuyen diversas propiedades beneficiosas para la salud. La soja ha sido el primer alimento al que la FDA (Food and Drug Administration) de EE.UU ha permitido aplicar una alegación sanitaria (FDA, 1999), que es también aceptada por la Joint Health Claims Initiative (JHCI) del Reino Unido (<http://jhci.org.uk/approv/schol2.htm>). La Unión Europea autoriza el empleo de los preparados de proteínas de soja como ingredientes alimentarios (Singh y col., 2008). En este apartado abordaremos los principales constituyentes bioactivos de la soja y sus aplicaciones en la formulación de alimentos funcionales lácteos y/o de tipo lácteo.

2. Componentes de la soja con propiedades beneficiosas para la salud

La composición de la semilla de soja varía en función de la variedad y las condiciones de cultivo. Típicamente, las semillas de soja están constituidas por 35-40% de proteínas, 15-20% de grasas, 30% de carbohidratos, entre 10 y 13% de humedad y alrededor del 5% de minerales y cenizas (http://www.asaim-europe.org/SoyInfo/composition_e.htm). La soja no contiene colesterol ni lactosa y entre sus componentes minoritarios destacan minerales, vitaminas, inhibidores de proteasas, compuestos fenólicos incluyendo isoflavonas, saponinas, fitatos, etc.

biológicamente activos a los que se les atribuyen propiedades beneficiosas para la salud.

2.1. Proteínas

Las proteínas son el componente más abundante de la soja de las cuales entre el 80 - 90% son proteínas de reserva. Las proteínas de soja se pueden además clasificar en función de sus coeficientes de sedimentación en gradiente de sacarosa. De acuerdo con esta metodología la fracción de proteínas de soja tiene cuatro componentes fundamentales 15S, 11S, 7S y 2S. Las fracciones 11S (rica en glicinina), 7S (compuesta por β -conglucina y γ -conglucina) y 2S (proteínas inhibidoras de la tripsina) constituyen la mayor parte de las proteínas de reserva (>85%) (Liu, 1997).

Se estima que cada año se encuentran disponibles para el consumo aproximadamente 63,6 millones métricos de proteínas de soja. Desde los años sesenta los productos a base de proteína de soja se vienen consumiendo como ingredientes nutritivos y funcionales (Singh y col., 2008). La composición de los diferentes formatos de las preparaciones de proteínas de soja que en la actualidad se encuentran comercialmente disponibles para su empleo como suplementos o fuentes de proteínas en alimentos se muestra en la Tabla 1. Estas preparaciones comerciales de proteínas de soja se obtienen principalmente a partir de soja desengrasada como se deduce de la información que se provee a continuación.

Las proteínas de soja constituyen las proteínas no lácteas que en mayor medida han demostrado su actividad biológica tanto en ensayos *in vitro*, *in vivo* y clínicos (Recio y López Fandiño, 2005). El consumo de proteínas de soja puede proporcionar efectos beneficiosos para la salud humana (Augustin y Muñoz, 2006; Singh y col., 2008; Azadhakht y Esmailzadeh, 2008), tales como disminución de la tensión arterial (Kitts y Weiller, 2003), reducción del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Appel, 2003), prevención a sufrir ciertos tipos de cáncer (Messina y

Flickinger, 2002), prevención frente a la osteoporosis (Messina y col., 2004; Zhang y col., 2005), reducción de los niveles de colesterol en sangre (Sirtori y col., 1995, 1998; Torres y col., 2006) o reducción de los síntomas de la menopausia (Dalais y col, 1998, Kotsopoulos y col., 2002). Los resultados relativos a la efectividad de las proteínas de soja en la obesidad son controvertidos (Azadbakht y Esmailzadeh, 2008). El consumo de soja ha demostrado tener efectos beneficiosos en síndromes metabólicos tanto en modelos animales como en humanos. El papel beneficioso del consumo de soja en diabéticos es otro motivo que justifica su inclusión en la dieta diaria (Azadbakht y Esmailzadeh, 2008). Estudios recientes empleando cerdos como modelo animal sugieren que un alto consumo de proteína de soja puede reducir la sensación de hambre, disminuir el consumo de alimentos y reducir los depósitos de grasa y en consecuencia mejorar la sensibilidad a la insulina (Dunshea y Cox, 2008).

Tabla 1. Composición aproximada de los preparados comerciales de proteínas obtenidos a partir de soja desengrasada y que comúnmente se emplean en la industria de los alimentos. Los datos están expresados como porcentaje de materia seca.

Productos	Proteínas	Carbohidratos	Fibra	Grasas	Cenizas
Harina de soja desengrasada	45-50	35-40	17-20	0,5-1,5	5,4-6,5
Concentrado de proteínas de soja	55-65	25-30	5-10	0,1-0,5	4,0-5,0
Aislado de proteínas de soja	> 90	3-4	<5	0,53-4,0	3,0-4,0

Fuente: USDA National Nutrient Database for Standard Reference (<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search>).

Se desconoce la contribución individual de las proteínas e isoflavonas de soja presentes en mezclas complejas, tales como los alimentos a base de esta legumbre o preparados comerciales enriquecidos en isoflavonas y proteínas, en la protección

frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y osteoporosis. Se especula que estos compuestos tienen una acción sinérgica. Las isoflavonas se encuentran de manera natural adheridas a las proteínas; por lo que generalmente, los estudios de bioactividad de estos compuestos se realizan con preparaciones en las que ambos están presentes en distintas proporciones. Los aislados de proteínas de soja, que es la preparación de proteínas más pura que se comercializa en la actualidad, se consideran una fracción rica en isoflavonas (50 mg/ 25 g de producto). Sin embargo, existen evidencias científicas que apoyan el papel de las fracciones de proteínas y péptidos de soja en la prevención de estas patologías (Omomi y Aluko, 2005). Así, la fracción 7S globulina de soja y péptidos sintéticos que contienen secuencias específicas de esta proteína han demostrado ser efectivos en la reducción de la concentración de colesterol plasmático en ratas (Sirtori y col, 1993; Lovati y col., 2000; Adams y col., 2004; Duranti y col., 2004). Los hallazgos derivados de los estudios realizados hasta la fecha indican que la fracción 7S globulina de soja estimula la expresión de receptores de las LDL y la degradación de LDL en cultivos de hepatocitos. Los datos obtenidos apoyan la hipótesis de que la digestión de estas proteínas resulta en la formación de péptidos bioactivos, que pueden ser absorbidos en el intestino delgado y tener efectos beneficiosos en el metabolismo de las lipoproteínas, y la salud cardiovascular mediante la regulación de la actividad de los receptores hepáticos de LDL. Estudios realizados empleando 7S globulina de soja sometida a extracción alcohólica, con objeto de eliminar las isoflavonas adheridas de forma natural al esqueleto de la proteína, condujeron a resultados similares sugiriendo que las moléculas activas son las proteínas y no las isoflavonas solubles en alcohol.

La 7S globulina o β -conglucina es una glicoproteína compuesta por un trímero de masa molecular de entre 150 y 210 kDa cuya estructura tridimensional se muestra en la Figura 1. Los resultados relativos acerca del papel de los residuos de

carbohidratos estructurales de esta proteína en su función biológica son escasos y controvertidos (Fu y col., 2007; Adams y col., 2008). En la actualidad la β -conglucina de soja aislada se comercializa (http://www.fujioil.co.jp/fujioil_e/index.html) como ingrediente funcional en Japón.

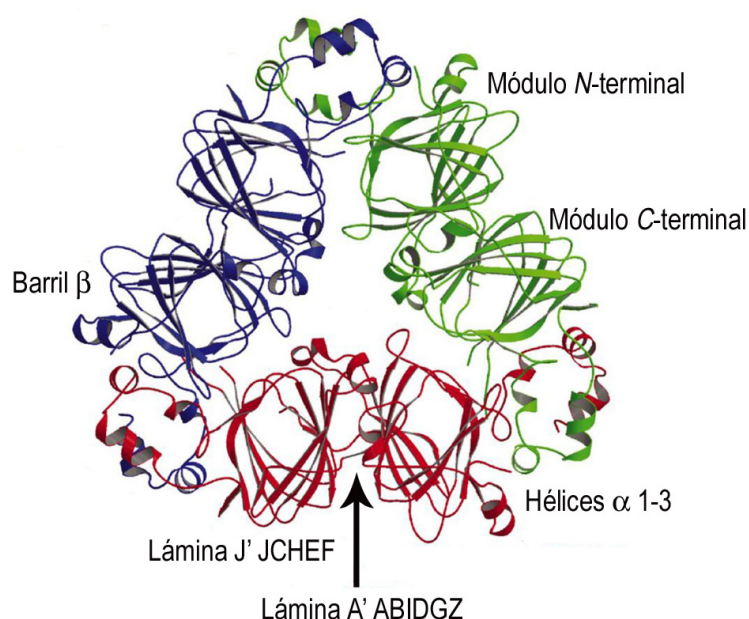


Figura 1. Estructura tridimensional de un homotrímero de β -conglucina. Tomado de Maruyama y col. (2004).

Existen evidencias científicas que indican que péptidos y aislados de proteínas de soja libres de isoflavonas tienen propiedades antioxidantes (Takenaka y col., 2003) y efectos protectores contra el cáncer (Azuma y col., 2000). En este sentido, se ha sugerido que fracciones de proteínas de soja de elevado peso molecular obtenidas por tratamiento con proteasas podrían emplearse como ingrediente funcional en la prevención de la actividad tumoral de los ácidos biliares en hígado y colon.

Desde el punto de vista nutricional las proteínas de soja presentan factores que actúan como antinutrientes, tales como los inhibidores de proteasas, debido al efecto

inhibitorio que ejercen sobre la tripsina y la quimiotripsina durante la digestión proteica en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, las preparaciones de proteínas de soja se someten a tratamientos térmicos de distinta intensidad encaminados a inactivar estos inhibidores. El más estudiado de los inhibidores de proteasas de soja ha sido el inhibidor de Bowman Birk (BBI). Recientemente (Augustin y Muñoz, 2006; Losso, 2008), se ha propuesto el término de “ingrediente funcional” para las proteínas BBI de soja cuya estructura se muestra en la Figura 2. Estas proteínas se consumen como parte de la dieta y han demostrado su eficacia como agente anticancerígeno en numerosos ensayos *in vitro*, modelos animales y estudios clínicos en humanos. Existen además evidencias que indican la potencialidad de las proteínas BBI en la prevención de enfermedades neurodegenerativas (Gran y col., 2006; Wang y col., 2008), artritis reumatoide, colitis ulcerosa y su efecto protector frente a las radiaciones que se emplean en la terapia del cáncer (Augustin y Muñoz, 2006).

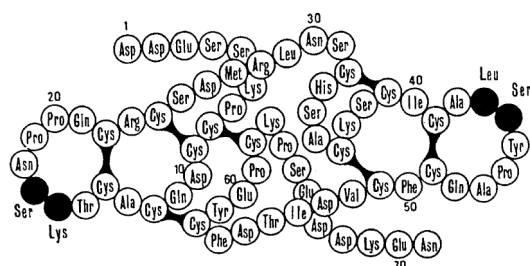


Figura 2. Estructura de las proteínas BBI de soja. Destacados en negro se representan los enlaces disulfuro que estabilizan la estructura y los aminoácidos que conforman los sitios de enlazaramiento de las proteasas tripsina y quimiotripsina.

De entre todas las actividades biológicas que se atribuye a la fracción proteica de la soja hasta la fecha sólo existe alegación sanitaria en relación a su efecto sobre lípidos séricos. En consecuencia, la alegación sanitaria autorizada por la FDA en alimentos que contienen como mínimo 6,25 g de proteína de soja, por ración servida es como sigue: “las proteínas de soja, conjuntamente con una dieta pobre en grasa y en colesterol, puede disminuir el riesgo de padecer enfermedad coronaria”. Esta alegación es similar a la aceptada por la JHCI (<http://jhci.org.uk/approv/schol2.htm>). La

autorización de esta alegación sanitaria ha tenido consecuencias muy importantes en el consumo y desarrollo de nuevos productos, en el comercio y en la investigación de los efectos de la soja en la salud (Aldeguer y Alejandre, 2007).

2.2. Compuestos fitoquímicos: Isoflavonas

El término *fitoquímicos* se emplea para describir una clase de compuestos químicos de origen vegetal con efecto en los organismos animales y humanos. La soja presenta varios compuestos fitoquímicos de los cuales el más destacable son las isoflavonas. Las isoflavonas son los flavonoides más abundantes y de mayor interés terapéutico de la soja. Las isoflavonas presentes de forma natural en la soja y en los alimentos no fermentados a base de soja se encuentran en su forma glicosilada siendo mayoritarias la genistina y daidzina (Figura 3, Tabla 2). Las formas glicosiladas son biológicamente inactivas. La conversión de las isoflavonas inactivas en activas tiene lugar *in vivo* por actividad de glicosidasas de las microflora intestinal. Por lo tanto, la biodisponibilidad de estos compuestos depende de su contenido en la dieta y la actividad de la microflora intestinal. Las isoflavonas parecen ser el componente bioactivo de la soja con mayor espectro de beneficios para la salud. La genisteína se cree que es la isoflavona con mayor actividad biológica de las que componen la soja. En alimentos fermentados las isoflavonas están presentes en su forma desglicosilada también denominadas agliconas (daidzeína y genisteína) (Rowland y col., 2003).

La soja es el único alimento que contiene isoflavonas en cantidades fisiológicamente relevantes. Factores tales como la variedad y las condiciones de cultivo determinan en última instancia la concentración de estos compuestos no-nutrientes bioactivos de soja y sus derivados. Los alimentos derivados de la soja contienen entre 0,2 y 3 mg isoflavona/g de producto (Riaz, 2006). La Tabla 2 muestra el contenido medio de las isoflavonas mayoritarias presentes en soja y sus derivados.

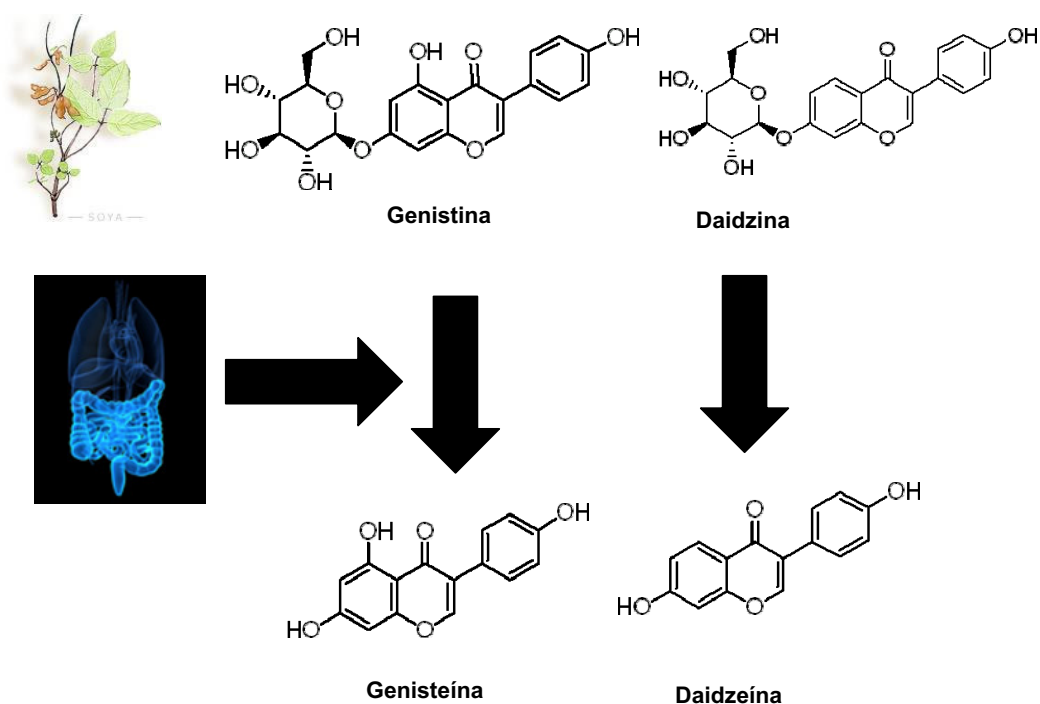


Figura 3. Principales isoflavonas de la soja. Formas glicosiladas biológicamente inactivas (parte superior) y formas desglicosiladas bioactivas (parte inferior).

En la base de datos consultada los resultados se expresan como el peso de la aglicona en 100 g de producto. El peso de la aglicona es aproximadamente el 60% de la forma glicosilada, por tanto, a menos que se mencione específicamente 100 mg de isoflavona pueden referirse a entre 60 y 100 mg de molécula activa. Para evitar confusiones en la Tabla 2 se hace uso del peso referido a la aglicona.

Las isoflavonas son también consideradas fitoestrogenos, o estrógenos vegetales, dada la similitud estructural y funcional que presentan con los estrógenos humanos. Los efectos estrogénicos de las isoflavonas de soja son de menor intensidad (~10000 veces) que los inducidos por las propias hormonas humanas. Las isoflavonas de soja ejercen un efecto tanto estrogénico como anti-estrogénico dependiendo del tejido en que actúan. Estos compuestos bioactivos también pueden

reducir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y actuar como antioxidante e inhibidor de enzimas celulares de gran importancia funcional tales como tirosina quinasa, entre otros efectos beneficiosos para la salud. El mecanismo de acción de la genisteína en la prevención de patologías como el cáncer aún es parcialmente desconocido y se cree que tiene lugar por diferentes vías, entre las que se incluyen la inhibición de la actividad de enzimas que intervienen en el desarrollo de la patología, bloqueo de la actividad hormonal e intervención en procesos celulares mediante los cuales las células cancerosas incorporan nutrientes y enzimas (Singh y col., 2008).

Tabla 2. Contenido en isoflavonas en la soja y sus derivados comúnmente empleados como ingredientes funcionales. Los datos se expresan como mg (peso de la aglicona)/ 100 g de producto. Los números de referencia se corresponden con los asignados a estos productos en la base de datos consultada.

Alimento (Referencia)	Contenido isoflavonas (mg/100g producto)			
	Genisteína	Daidzeína	Gliciteína	Total
Soja cruda comercial (99091)	91,71	52,20	12,07	153,40
Harina de soja desengrasada (16117)	71,21	57,47	7,55	131,19
Concentrado de soja (99060)	55,59	43,04	5,16	102,07
Aislado proteico de soja (16122)	59,62	33,59	9,47	97,43

Fuente: U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.
(<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/isoflav/isoflav.html>)

Los concentrados de isoflavonas que se emplean para suplementar alimentos pueden obtenerse por extracción química como un sub-producto de la elaboración de concentrados y aislados de proteínas de soja y por extracción mecánica. Éstos se encuentran disponibles en tres formatos fundamentales (granulados, harina y polvo fino) y se adicionan a alimentos diversos. Los concentrados obtenidos por extracción química y mecánica presentan distinta composición cuantitativa. El germen de soja contiene 5 ó 6 veces más isoflavonas que el resto del grano y además contiene otros

componentes bioactivos entre los que se incluyen proteínas, ácidos grasos esenciales ω -3 y ω -6, lecitina, vitamina E y saponinas (Riaz, 2006).

2.3. Carbohidratos prebióticos y fibra

Los carbohidratos son el segundo compuesto más abundante de la soja lo que indica que tiene un importante valor económico para la industria de los alimentos. Los granos de soja contienen una mezcla de carbohidratos solubles e insolubles (fibra dietética) que representan aproximadamente el 30% de su contenido total.

La fracción de carbohidratos solubles está constituida por sacarosa y oligosacáridos que representan alrededor del 10% de los componentes de la soja. Los oligosacáridos de la soja, rafinosa (α -D-galactosa (1-6)- α -D-glucosa (1-2)- β -D-fructosa) y estaquiosa (α -D-galactosa (1-6)- α -D-galactosa- (1-6)- α -D-glucosa (1-2)- β -D-fructosa) son resistentes a la digestión debido a los enlaces α -galactósidos que conforman su estructura (Figura 4). El contenido de rafinosa y estaquiosa en semillas maduras de soja es del orden de 2,5-8,2 % y 1,4-4,5%, respectivamente. Los niveles de los oligosacáridos de la soja varían en función de la variedad y las condiciones agronómicas (Bainy y col., 2008).

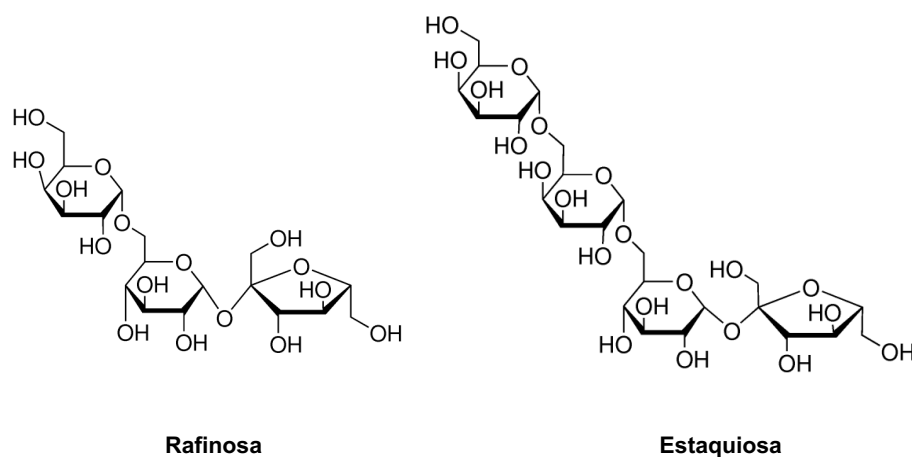


Figura 4. Oligosacáridos prebióticos de la soja.

Los oligosacáridos de la soja constituyen uno de los principales carbohidratos prebióticos utilizados actualmente como ingredientes en alimentación. Los prebióticos se definen como aquellos ingredientes no digeribles que en el colon estimulan selectivamente el crecimiento o la actividad de un número limitado de bacterias consideradas como beneficiosas para la salud (Gibson y Roberfroid, 1995). Estos compuestos además causan otros efectos beneficiosos en la salud humana tales como la reducción de los niveles de colesterol, reducción de la tensión arterial y prevención de algunos tipos de cáncer (Roberfroid, 2007). Sin embargo, los oligosacáridos de la soja pueden causar flatulencia y distensión abdominal lo que constituye un problema para su utilización en países Occidentales. Éstos se comercializan y emplean como suplementos dietéticos e ingredientes funcionales en Japón (Riaz, 2006).

La fracción de carbohidratos insolubles de la soja, fibra dietética, provienen fundamentalmente de la cáscara y las estructuras de la pared celular del grano de soja y se compone mayoritariamente por polisacáridos no celulósicos y minoritarios celulósicos (10%). Entre los no celulósicos destacan polisacáridos ácidos, compuesto por un núcleo básico de ácido D-galacturónico y L-ramnosa y ramificaciones constituidas por residuos de galactosa y arabinosa. Estudios recientes demuestran que la composición en carbohidratos de la soja puede ser optimizada vía fitomejoramiento lo que amplía el rango de aplicaciones de la soja cruda y los sub-productos generados durante la elaboración de aislados de proteínas de soja (Bainy y col., 2008). Las investigaciones realizadas indican que este componente también contribuye a los beneficios para la salud que se asocian con el consumo de soja tales como reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, cáncer y mejora del funcionamiento intestinal (Riaz, 2006).

En comparación con otras fibras dietéticas destinadas al consumo humano, la fibra de soja presenta efectos beneficiosos desde el punto de vista funcional,

nutricional y fisiológico. Fibras solubles como las gomas y pectinas, reducen los niveles de colesterol y normalizan la glucosa pero son difíciles de incorporar en alimentos y no son bien aceptados por los consumidores. Fibras como el salvado de trigo son efectivas en la prevención y el tratamiento del estreñimiento pero tampoco son bien aceptadas por los consumidores durante largos periodos de tiempo. La fibra de soja parece ser el mejor de los suplementos de fibra comercialmente disponible (Slavin, 1991).

Existen dos fuentes de fibras de soja comercialmente disponibles los cuales se obtienen a partir de la cáscara entera del grano de soja y del cotiledón del grano de soja siendo distinta su composición. La cáscara contiene un 92% de fibra, 3,5% de humedad, 0,5% de grasas, 1,5% de proteínas y 2,5% de cenizas mientras que la fibra del cotiledón se compone típicamente de un 75% de fibra (65% polisacáridos no celulósicos y 10% polisacáridos celulósicos), 12% de humedad, 0,2% de grasas y 4,5% de cenizas. Estos productos pueden considerarse como sub-productos del proceso de elaboración de aislados de proteínas (Riaz, 2006).

La fibra de soja puede añadirse a diversos alimentos y está disponible en varios formatos. Diferentes fuentes de fibra de soja se emplean en dietas líquidas, especialmente en fórmulas para la nutrición enteral hospitalaria, o en la producción de panes hipocalóricos y bollería industrial, tales como magdalenas y galletas.

2.4. Lípidos

La mayor proporción de componentes grasos de la soja corresponden a ácidos grasos insaturados. En el perfil de ácidos grasos del aceite de soja destacan el ácido oleico (22%), el ácido linoleico (18:2, ω -6, 54%) y el linolénico (18:3, ω -3, 7.5%). Los ácidos grasos oleico y del tipo ω -3 ejercen efectos antiaterogénicos por lo que su presencia en la soja se asocia a las propiedades de esta legumbre para prevenir el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Gran parte de los ácidos grasos de la soja

se encuentran formando parte de la lecitina que es considerada como un nutraceutico (Riaz, 2006). Por otra parte, la soja presenta un bajo contenido en ácidos grasos saturados, ya que no contiene colesterol, y presenta fitoesteroles y tocoferoles (vitamina E) (Riaz, 2006).

La lecitina de soja se aísla del aceite de soja y se encuentra comercialmente disponible en su forma natural y modificada. Los estudios realizados hasta el momento indican que la aplicación de lecitina de soja no modificada en la elaboración de derivados lácteos no es factible desde el punto de vista sensorial. Queda pendiente de estudio la aplicación de lecitina modificada y la aceptabilidad de la adición de ambas formas a productos fermentados (Suriyaphan y col., 2001).

2.5. Aplicaciones de los compuestos de la soja en la elaboración de alimentos lácteos funcionales y de tipo lácteo

La soja se considera en si misma un alimento multifuncional natural apto para el consumo humano de elevada calidad nutricional dado que contiene mayor contenido en proteínas que la carne de vacuno, más calcio que la leche de vaca, más lecitina que el huevo además de vitaminas, minerales y diversos compuestos biológicamente activos a los que ya se ha hecho referencia anteriormente. Desde el punto de vista económico su cultivo es rentable. Sin embargo, sus peculiares características organolépticas dificultan, a día de hoy, su empleo extensivo como alimento multifuncional en los países occidentales. Dado los diversos beneficios para la salud que del consumo sistemático de la soja y/o sus componentes se derivan se están realizando grandes esfuerzos para elaborar nuevos productos a base de soja que reúnan las propiedades sensoriales requeridas por los consumidores. En consecuencia, en el mercado internacional pueden encontrarse una gran variedad de productos fermentados y no fermentados a base de soja o de ingredientes alimentarios

derivados de ésta. Las aplicaciones de la soja y sus componentes en la industria de los alimentos han sido revisadas en detalle por Tripathi y Misra (2005), Riaz (2006) y Singh y col. (2008). Proteínas, isoflavonas y carbohidratos de soja se emplean fundamentalmente en la elaboración de alimentos a bases de cereales, productos derivados de la carne, bebidas y **productos lácteos o de tipo lácteo** a los que nos referiremos a continuación. Es de destacar que las preparaciones comerciales de proteínas (harinas, concentrados y aislados) son los ingredientes derivados de la soja que principalmente se emplean en la elaboración de alimentos. Estas preparaciones, como se ha comentado anteriormente, presentan diferente composición y contienen otros ingredientes bioactivos (Tablas 1 y 2). Los ejemplos que se presentan a continuación implican, en la mayoría de los casos, los diferentes formatos de preparados comerciales de proteínas de soja.

Los productos lácteos tienen un creciente interés como alimentos funcionales. La gran variedad de derivados lácteos que existen en el mercado, y la aceptación de los consumidores a la constante comercialización de productos innovadores por parte del sector lácteo indican que la leche es un vehículo interesante para incorporar ingredientes que no la componen de manera natural. Los consumidores tienen la creencia de que los productos lácteos son un alimento básico, saludable y por tanto fundamental de la dieta diaria. Son muchos los ejemplos de alimentos funcionales lácteos que se comercializan en la actualidad en todo el mundo. Prebióticos, probióticos, ácidos grasos ω -3, fitoesteroles, tocoferoles, vitaminas y minerales se emplean comúnmente como ingredientes funcionales en productos lácteos. La soja constituye una fuente natural de bajo coste y apta para el consumo humano de muchos de estos componentes con aplicación en la elaboración de lácteos funcionales y otros muchos alimentos de naturaleza diversa.

Actualmente, se comercializan diferentes productos lácteos suplementados con proteínas de soja (Recio y López-Fandiño, 2005). Existen dos gamas de productos,

fermentados y no fermentados que pueden bien elaborarse mezclando proteínas de soja y lácteas, o empleando como única fuente proteica la soja, teniendo estos alimentos una formulación similar o idéntica a los lácteos convencionales “alimentos tipo lácteos”. Estos últimos tienen como fin su empleo como alternativa a los lácteos en la alimentación de grupos poblacionales con requerimientos nutricionales específicos tales como alérgicos a las proteínas lácteas, intolerantes a la lactosa y vegetarianos estrictos entre otros.

2.6. Alimentos lácteos y tipo lácteos no fermentados

Las **proteínas de soja** pueden emplearse en la elaboración de bebidas ácidas y neutras tanto en solitario como conjuntamente con otras fuentes de proteínas tales como las de origen lácteo. Las bebidas que contienen proteínas lácteas tienen una presencia predominante en los países occidentales. Sin embargo, dado los demostrados beneficios de las proteínas de soja descritos para la salud humana, la presencia de bebidas a base de mezclas de proteínas lácteas y de soja, que incluyen leches enriquecidas y cremas para el café, se ha visto incrementada. La obtención de un producto final de calidad óptima requiere la completa solubilización de ambas fuentes proteicas. Los detalles tecnológicos de los procesos de elaboración de estos productos han sido previamente descritos por Riaz (2006). La leche de soja es fácil de digerir y puede emplearse como sustituto de la leche de vaca (Singh y col., 2008). Otro alimento lácteo no fermentado de creciente popularidad en países occidentales incluyendo España, con especial aceptación por la población femenina adulta, son las leches suplementadas con **isoflavonas de soja**.

Entre las bebidas cuya formulación incluye como única fuente de proteínas a las de soja caben destacar fórmulas infantiles, bebidas para cubrir necesidades nutricionales específicas, sucedáneos ó sustitutos de la leche de vaca y bebidas para

el control del peso entre otras. La suplementación con aminoácidos, vitaminas y minerales de determinados alimentos tales como fórmulas infantiles, es una práctica habitual aceptada. La utilización de las proteínas de soja en alimentos dirigidos a comedores escolares y otros preparados institucionales ofrece posibilidades únicas que no se podrían obtener empleando otra fuente de proteínas por razones de coste, de estabilidad y facilidad de la preparación o consideraciones médicas, como por ejemplo fórmulas infantiles hipoalergénicas. Las proteínas de sojas son una fuente proteica adecuada para la obtención de fórmulas especiales de uso en geriatría, hospitales y alimentación prospectiva con el fin de completar los requerimientos nutricionales, obtener contenido calórico específico y conseguir un balance entre las calorías aportadas por proteínas, grasas y carbohidratos (Singh y col. 2008).

Con el desarrollo de los concentrados y aislados solubles se ha hecho posible la elaboración de alimentos infantiles de una calidad superior. Estas preparaciones poseen mejores propiedades organolépticas (color, sabor y olor) y no contienen carbohidratos que pueden causar flatulencia. Aproximadamente, el 10% de las fórmulas infantiles contienen proteínas de soja. Las fórmulas infantiles a base de proteínas de soja se recomiendan para aquellos niños que presentan alergia a las proteínas lácteas y los que resultan intolerantes a la lactosa o deficientes de lactasa. Además de las fórmulas que no contienen proteínas lácteas o fórmulas infantiles a base de soja como única fuente de proteínas, existen otras fórmulas especiales que utilizan derivados de soja y que se emplean en las últimas etapas de la infancia, geriatría, nutrición hospitalaria y alimentación prospectiva.

2.7. Alimentos lácteos o tipo lácteos fermentados

Las proteínas de soja se emplean como ingredientes funcionales en la elaboración de yogures y mezclas con leche de origen animal. La adición puede realizarse a leche fermentada y no fermentada. La calidad sensorial de la leche

fermentada preparada a base de mezclas de leche de búfala y de soja resulta satisfactoria (Iñiguez y col. 2001). En España se comercializan yogures a base únicamente de proteínas de soja y derivados lácteos a los que se les adicionan concentrados de soja. Yogures con concentraciones de proteínas de soja de entre 1 y 2,5% son similares a los productos convencionales. La suplementación de los yogures a base de leche con baja pero significativa cantidad de proteínas de soja es una vía aceptada de introducción de proteínas de soja en la dieta.

Las proteínas de soja se emplean como ingredientes en quesos sustituyendo hasta en un 50% al caseinato sódico. Se elaboran productos fermentados de tipo queso pero se requieren más investigaciones para mejorar la textura y propiedades reológicas de estos productos (Singh y col., 2008).

Los aislados de proteínas de soja son la fuente más aceptada para su aplicación como ingrediente en productos lácteos dado su tamaño de partícula y grado de dispersión. Propiedades tecnológicas tales como la emulsificación o gelificación, o sensoriales como el color y sabor/olor son factores críticos para su aplicación en productos lácteos. A pesar del gran potencial que ofrecen los aislados de proteínas de soja en la producción de productos lácteos, estos alimentos no se producen en gran volumen en los países occidentales, siendo China y Japón los mayores productores de este tipo de alimentos. En Estados Unidos se comercializan pocos alimentos, tales como crema para café, nata líquida y otras emulsiones, con el fin de sustituir al caseinato sódico. Actualmente, se están haciendo grandes esfuerzos para aplicar las proteínas de soja en otros alimentos lácteos que incluyen bebidas alternativas a la leche de vaca, bebidas en polvo, postres congelados y productos similares a los quesos.

Las proteínas de soja tienen asegurado su papel como ingredientes en alimentos análogos o sustitutos lácteos elaborados para personas con requerimientos dietéticos especiales debido a problemas de salud y/o creencias religiosas. Las

harinas de soja se emplean como una alternativa a las proteínas lácteas en la elaboración de bebidas de bajo coste para el consumo humano en países en desarrollo. El mercado de las bebidas de soja ha crecido rápidamente. Los concentrados de soja se emplean en la alimentación de crías de animales tales como el cordero y cerdo, dado que contienen un bajo contenido en carbohidratos solubles. Las proteínas se emplean para formar emulsiones grasas como un método para incorporar grasas en la formulación y suministrar proteínas con interés nutricional.

Mezclas de proteínas de leche y soja en una concentración final similar a la presente en la leche se emplean en la elaboración de productos de panadería, salchichas, productos cárnicos, y para la sustitución completa o parcial de la leche en polvo desnatada. Aunque, en la actualidad en EEUU y Europa se restringe la imitación o modificación de los productos lácteos. Sin embargo, tarde o temprano nuevos productos, con mejores propiedades sensoriales y funcionales tendrán un papel más relevante en la elaboración de productos lácteos.

Conclusiones y futuro

Existen evidencias científicas que prueban que el consumo de soja protege frente a enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y la osteoporosis. El número de aplicaciones de la soja y sus componentes en la elaboración de alimentos funcionales es elevado. Así, el mercado de los productos lácteos ha incorporado con éxito a la soja y sus derivados como un componente saludable y habitual con la aceptación de los consumidores. Se cree que la soja será el alimento funcional saludable del siglo XXI.

El sabor de las proteínas de soja y su interacción con compuestos deseables e indeseables que participan en sus propiedades organolépticas es crítico y determina la aceptabilidad de alimentos que contienen preparaciones de soja y la aplicación de proteínas de soja. Se han realizado muchos progresos en este sentido pero el sabor residual siempre permanece. El sabor es un problema crítico especialmente en alimentos insípidos o de muy poco sabor tales como los productos lácteos que requiere ser aún mejorado.

Queda pendiente de contestación qué componente en concreto de los alimentos de soja es responsable de su efecto protector frente a las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y la osteoporosis; así como, sus efectos potenciales en la prevención y el tratamiento de otras enfermedades contemporáneas como el Alzheimer. Otras áreas pendientes de investigación son las posibles variaciones de los efectos de la soja en los diferentes tejidos como consecuencia del procesado del alimento (fermentados o no fermentados) y los efectos sinérgicos de muchos de los compuestos bioactivos de la soja. El estudio de la estabilidad de los ingredientes funcionales frente a los procesos de elaboración y conservación de alimentos es fundamental. Igualmente, es necesario el estudio de la actividad biológica de los metabolitos derivados de los componentes de la soja, y conocer si se alcanzan

concentraciones fisiológicamente relevantes en los tejidos donde ejercen su acción. Es importante el estudio de las interacciones entre constituyentes del alimento durante el proceso de elaboración y tránsito por el tracto gastrointestinal. Los resultados que se deriven de estas investigaciones permitirán optimizar procesos para obtener alimentos de soja más saludables y una mejor formulación de alimentos funcionales empleando ingredientes obtenidos a partir de esta legumbre. Sin duda, el número de aplicaciones de la soja y sus derivados se ampliará y no se descarta que el sector lácteo dadas sus características sea uno de los más beneficiados en este sentido.

Agradecimientos

Las investigaciones llevadas a cabo por los autores del presente capítulo relacionadas con la potencialidad de los componentes de la soja como ingredientes de alimentos funcionales han recibido financiación de los siguientes proyectos: CYTED N° XI.24; ALIBIRD S-0505/AGR/000153 y Programa CONSOLIDER INGENIO 2010 FUN-C-FOOD CSD 2007-063.

Referencias

- Adams, M. R., Anthony, M. S., Chen, H., Clarkson, T. B. (2008). Replacement of dietary soy 7S or 11S globulin has minimal or no effects on plasma lipoprotein profiles and biomarkers of coronary risk in monkeys. *Atherosclerosis*, 196, 76-80.
- Adams, M. R., Golden, D.L., Franke, A. A., Potter, S. M., Smith, H. S., Anthony, M. S. (2004). Dietary Soy β -conglycinin (7S Globulin) inhibits atherosclerosis in mice. *The Journal of Nutrition*, 134, 511-516.
- Aldeguer V. P. & Alejandre, A. P. (2007). La Salud y la Soja. Madrid: *Grupo Leche Pascual-EDIMSA*.
- Appel, L. J. (2003). The effects of protein intake on blood pressure and cardiovascular disease. *Current Opinion in Lipidology*, 14, 55-59.
- Augustin et al., O. M., Muñoz, E. M. V. (2006). Proteins and peptides in enteral nutrition. *Nutrición Hospitalaria*, 21, 1-13.
- Azadbakht, L., Esmailzadeh, A. (2008). Soy and cardio-metabolic abnormalities: an update. *Journal of Research in Medical Sciences*, 13, 88-96.
- Azuma, N., Machida, D., Saeki, T., Kanamoto, R., Iwami, K. (2000). Preventive effect of soybean resitant proteins against experimental tumorigenesis in rat colon. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 46, 23-29.
- Bainy, E. M., Tosh, S. M., Corredig, M., Poysa, V., Woodrow, L. (2008). Varietal differences of carbohydrates in deffated soybean flour and soy protein isolate by-products. *Carbohydrate Polymers*, 72, 664-672.
- Dalais, F. S., Rice, G. C., Wahlquist, M. L., Grehan, M., Murkies, A. L., Medley, G. (1998). Effects of dietary phytoestrogens on postmenopausal women. *Climateric*, 1, 124-129.
- Dunshea, F. R., Cox, M. L. (2008). Effect of dietary protein on body composition and insulin resistance using a pig model of the child adolescent. *Nutrition & Dietetics*, 65, S60-S65.
- Duranti, M., Lovati, M. R., Dani, V., Barbiroli, A., Scarafoni, A., Castiglioni, S., Ponzzone, C., Morazzoni, P. (2004). The α' subunit from soybean 7S globulin Powers plasma lipids and upregulates liver β -VLDL receptors in rats fed a hypercholesterolemic diet. *The Journal of Nutrition*, 134, 1334-1339.
- FDA (1999). Food labelling. Health claims: soy protein and coronary heart disease. *Food and Drug Administration*, 21 CFR Part 101, Oct 26.

- Fu, C. J., Jez, J. M., Kerley, M. S., Allee, G. L., Krishnan, H. B. (2007). Identification, characterization, epitope mapping, and three-dimensional modeling of the α -subunit of β -conglycinin of soybean, a potential allergen for young pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 4014-4020.
- Gibson G. R., Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125, 1401-1412.
- Gran, B., Tabibzadeh, N., Martin, A., Ventura, E. S., Ware, J. H., Zhang, G. X., Parr, J. L., Kenned, A. R., Rostami, A. M. (2006). The protease inhibitor, Bowman-Birk Inhibitor, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: a potential oral therapy for multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 12, 688-697.
- Iñiguez, C., Núñez, M., Cardoso, F. (2001). Elaboración de una leche fermentada con mezclas de leches de búfala y de soya. *Alimentaria. Revista de tecnología e higiene de los alimentos*, 322, 63-66.
- Kitts, D. D., Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1309-1323.
- Kotsopoulos, D., Dalais, F. S., Liang, Y. L., McGrath, B. P., Teede, H. J. (2002). The effects of soy protein containing phytoestrogens on menopausal symptoms in postmenopausal women. *Climateric*, 3, 161-167.
- Liu, K. S. (1997). Soybean, chemistry, technology, and utilization. New York: International Thomson Publishing
- Losso, J. N. (2008). The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 94-118.
- Lovati, M. R., Manzoni, C., Gianazza, E., Arnoldi, A., Kurowska, E., Carrol, K. K., Sirtori, C. R. (2000). Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. *The Journal of Nutrition*, 130, 2543-2549.
- Maruyama, Y., Maruyama, N., Mikami, B., Utsumi, S. (2004). Structure of the core region of the β -conglycinin α' subunit. *Acta Crystallographica*, D60, 289-297.
- Messina, M., Flickinger, B. (2002). Hypothesized anticancer effects of soy: evidence points to isoflavones as the primary anticarcinogens. *Pharmaceutical Biology*, 40, 6-23
- Messina, M., Ho, S., Alekel D.L. (2004). Skeletal benefits of soy isoflavones: a review of the clinical trial and epidemiologic data. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 7 (6): 649-658.

- Omoni, A. O., Aluko, R. E. (2005). Soybean Foods and their benefits: Potential mechanisms of action. *Nutrition Reviews*, 63, 272-283.
- Recio, I., López-Fandiño, R. (2005). Ingredientes y productos lácteos funcionales: bases científicas de sus efectos en la salud. En: M. Juárez, A. Olano, F. Morais. *Alimentos funcionales* (pp 23-100) Madrid: Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología.
- Riaz, M. N. (2006). *Soy Applications in Food*. Boca Ratón: CRC Taylor & Francis group.
- Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. Effects of probiotics and prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 137, 839S-837S.
- Rowland, I., Faughnan, M., Hoey, L., Wahala, K., Williamson, G., Cassidy, A. (2003). Bioavailability of phyto-estrogens. *British Journal of Nutrition*, 89, S45-S58.
- Sariyapahan, O., Cadwallader, K. R., Drake, M. A. (2001). Lecithin associates off-aromas in fermented milk. *Journal of Food Science*, 66, 517-523.
- Singh, P., Kumar, R., Sabapathy, S. N., Bawa, A. S. (2008). Functional and Edible uses of soy protein products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7, 14-28.
- Sirtori, C.R., Even, R., Lovati, M. R. (1993). Soybean protein diet and plasma cholesterol: from therapy to molecular mechanism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 676, 188-201.
- Sirtori, C. R., Lovati, M. R., Manzoni, C., Monetti, M., Pazzuconi, F., Gatti, E. (1995). Soy and cholesterol reduction: clinical experience. *The Journal of Nutrition*, 125, 598S-605S.
- Sirtori, C. R., Lovati, M. R., Manzoni, C., Gianazza, E., Staels, B., Auwerx, J. (1998). Reduction of serum cholesterol by soy proteins: clinical experience and potential molecular mechanisms. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 8, 334-340.
- Slavin J. (1991). Nutritional benefits of soy protein and fiber. *Journal of the American Dietetic Association*. 91, 816-819.
- Takenaka, A., Annaka, H., Kimura, Y., Aoki, H., Igarashi, K. (2003). Reduction of paraquat-induced oxidative stress in rats by dietary soy peptide. *Bioscience Biotechnology, and Biochemistry*, 67, 278-283.
- Torres, N., Torre-Villalvazo, I., Tovar, A. R. (2006). Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders. *The Journal of Nutrition Biochemistry*, 17, 365-373.

- Tripathi, A. K., Misra, A. K. (2005). Soybean- a consummate functional food. A review. *Journal of Food Science & Technology*, 42, 111-119.
- Wang, Y., Luo, W., Reiser, G. (2008). Trypsin and trypsin-like proteases in the brain: proteolysis and cellular functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 237-252.
- Zhang, X., Shu, X., Li, H. (2005). Prospective cohort study of soy food consumption and risk of bone fracture among postmenopausal women. *Archives of International Medicine*, 165, 1890-1895.

Valorización de proteínas del lactosuero por interacción con polisacáridos.

Piloso^f, Ana M.R.; Pérez^a, Oscar E.; Martínez^a, Karina D.; Martínez, María J.;

Camino^a, Nerina A. & Jara^a, Federico L.

Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Intendente Güiraldes s/n, Ciudad Universitaria, Buenos Aires, Argentina. (1428)

^a*Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina.*

Tel Fax: 5411-45763377 / 66

apiloso@di.fcen.uba.ar

Introducción

Los polisacáridos se utilizan en productos lácteos para mejorar la textura de un producto, otorgar cuerpo a formulaciones líquidas y producir geles lácteos en productos tales como leches saborizadas, yogures bebibles, flanes, etc. En helados, los polisacáridos previenen el crecimiento de cristales de hielo causado por fluctuaciones en la temperatura de almacenamiento y provee un comportamiento de fusión lenta. Por otro lado, los polisacáridos aumentan la vida útil de productos lácteos, previniendo efectos tales como el exudado de suero, o precipitación y floculación de partículas dispersas en productos tales como bebidas lácteas frutales, leche chocolatada, cremas, etc.

La interacción entre proteínas lácteas y polisacáridos lleva a fenómenos tales como incompatibilidad o coacervación compleja, mientras que la miscibilidad en soluciones mixtas es un comportamiento casi excepcional. El control o la manipulación de estas interacciones macromoleculares, es un factor clave para el desarrollo de nuevos productos alimenticios e ingredientes (Tolstoguzov, 1997).

La mezcla de proteínas y polisacáridos puede originar una fase estable o fases separadas, dando cuatro tipos de sistemas que difieren en sus estructuras y propiedades: 1) una sola fase conteniendo complejos solubles estabilizados por

interacciones electrostáticas y uniones puente hidrógeno; 2) una sola fase conteniendo los diferentes biopolímeros en dominios en los cuales ambos polímeros se excluyen mutuamente debido a una limitada incompatibilidad termodinámica; 3) formación de un complejo electrostático insoluble y una fase soluble (coacervación); 4) un sistema de dos fases en que ambos biopolímeros están principalmente en fases diferentes (emulsión agua – agua) debido a una incompatibilidad termodinámica (Ledward, 1994; Samant y col., 1993).

La formación de complejos electrostáticos es usualmente un proceso reversible que depende del pH y la fuerza iónica del medio, entre otros factores y está favorecida cuando los componentes presentan cargas opuestas, lo cual ocurre en general a $\text{pH} < \text{pI}$ de la proteína. A pH neutro pueden ocurrir interacciones electrostáticas débiles entre polisacáridos aniónicos y subunidades cargadas positivamente de proteínas oligoméricas (Tolstoguzov, 1997). Durante la formación de los complejos electrostáticos, la carga neta disminuye, reduciéndose la hidrofiliidad y la solubilidad del complejo. Las partículas dispersas de complejo insoluble se agregan y precipitan, formando un coacervado.

Algunas aplicaciones industriales de complejos proteína – polisacárido son la purificación de macromoléculas (ej. proteínas); microencapsulación; ingredientes alimenticios: sustitutos de grasas, aceites, crema, análogos de carne, biomateriales: formación de films comestibles, empaquetamiento, injertos y bioprótesis en medicina (Schmitt y col., 1998). En alimentos se aplican en la estabilización de productos lácteos procesados, inhibición de la precipitación de proteínas (en bebidas lácteas saborizadas), recuperación de proteínas (de plasma y lácteas), estabilización de calcio en proteínas vegetales sensibles al calcio, formación de geles, concentración y purificación de proteínas, texturización de proteínas, extrusión termoplástica, modificación enzimática: inhibiciones por interacciones enzima – polisacárido (Samant y col., 1993).

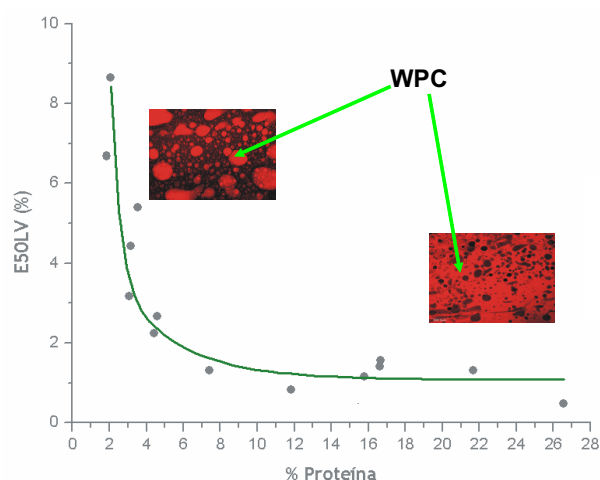


Figura 1. Diagrama de fases mostrando la curva binodal correspondiente al sistema WPC 80/HPMC (Dow Chem.E50LV).

La incompatibilidad termodinámica se observa en condiciones en las cuales la formación de complejos está inhibida y se promueve la asociación entre macromoléculas del mismo tipo. Esto ocurre principalmente a un pH mayor que el pI de la proteína. La Figura 1 representa un diagrama de fases de la mezcla de soluciones de proteína del lactosuero (WPC 80) e hidroxipropilmetilcelulosa (E50LV). La región debajo de la curva binodal, corresponde a una única fase formada por una solución de ambos biopolímeros, mientras que la región superior representa un sistema de dos fases. A una concentración total de biopolímero mayor a 6% las soluciones acuosas se separan en dos fases, que coexisten en equilibrio, formándose una emulsión agua / agua, la cual presenta una tensión interfacial muy baja. Dependiendo de las concentraciones relativas de proteína y polisacárido la fase continua de las emulsiones será WPC o HPMC, como muestran las imágenes confocales en la Figura 1. Un fenómeno de limitada incompatibilidad termodinámica se presenta a bajas concentraciones, por debajo de la curva binodal, donde si bien ambos polímeros se encuentran en la misma fase, sus volúmenes se excluyen. La incompatibilidad o la limitada incompatibilidad entre los biopolímeros incrementa la actividad termodinámica, es decir la concentración efectiva y el potencial conformacional de ambos. El potencial conformacional puede definirse como la

habilidad de un biopolímero para formar uniones intermoleculares que contribuyen a potenciar propiedades físico – químicas, reológicas y estructurales, por ejemplo la formación de geles, estabilización de espumas y emulsiones (Tolstoguzov, 1993).

La incompatibilidad termodinámica presenta numerosas aplicaciones: concentración de soluciones proteicas por "ósmosis sin membrana", fraccionamiento de biopolímeros, cambios en las propiedades funcionales de las macromoléculas donde la actividad termodinámica de cada componente aumenta en la mezcla, comportándose como si estuvieran en soluciones de mayor concentración.

A continuación se discute el impacto del fenómeno de incompatibilidad (separación de fases) o limitada incompatibilidad termodinámica (sin separación macroscópica de fases) entre proteínas del lactosuero y polisacáridos en propiedades de agregación, gelificación, interfaciales y de espumado.

1. Propiedades de gelificación y agregación de mezclas de proteínas del lactosuero y polisacáridos

La gelificación de la beta-lactoglobulina ha sido estudiada extensamente debido a sus excelentes propiedades gelificantes y por ser considerada una proteína modelo para el estudio de la gelificación térmica de proteínas globulares. A pH neutro se ha reportado que la concentración mínima para obtener un gel es de alrededor del 10 %, dependiendo de la muestra de proteína utilizada, en la que puede variar el proceso de obtención de la misma (Ould Eleya y col, 2000) y de las condiciones del medio, tales como la fuerza iónica o la presencia de sales (Ndi y col, 1996).

En mezclas de proteínas y polisacáridos, ambos gelificantes, en condiciones de incompatibilidad termodinámica, se pueden originar dos tipos de geles, rellenos o mixtos. Los geles rellenos se obtienen cuando uno de los componentes puede formar una red continua en todo el sistema y el otro componente polimérico sirve como relleno del gel. Estos geles pueden ser de una fase (el relleno está en un estado

molecular disperso) o en dos fases (la fase dispersa consiste en partículas líquidas o gel). Geles mixtos se obtienen cuando las dos macromoléculas forman redes continuas separadamente y debe ser tratado como un caso específico de redes poliméricas homogéneas e interpenetradas (Samant y col., 1993; Tolstoguzov, 1997). Los geles de mezclas de biopolímeros presentan propiedades viscoelásticas diferentes a las de uno solo de los componentes (Doublier y col., 1992). Se ha estudiado el comportamiento de geles mixtos de proteínas del lactosuero y polisacáridos formados en condiciones de incompatibilidad termodinámica, sin embargo se han utilizado concentraciones de proteína por encima de la mínima necesaria para gelificar (Fernández, 1994; Syrbe y col., 1995; Ndi y col., 1996; Zasytkin y col., 1996; Walkenstrom y col., 1998; Beaulieu y col., 2001). La presencia de polisacáridos en estos sistemas se refleja en las siguientes formas: disminución de la concentración mínima de proteína para gelificar, disminución en la temperatura o tiempo de gelificación, variación en la textura, microestructura, apariencia y retención de agua de los geles.

En general, en condiciones de incompatibilidad termodinámica, la concentración crítica para gelificar de los componentes gelificantes disminuye en las mezclas (Baeza y col., 2002; Capron y col., 1999) dado que el fenómeno de incompatibilidad termodinámica aumenta la concentración efectiva de ambos biopolímeros en fases coexistentes. Esto facilita la interacción proteína-proteína y durante el calentamiento permite la agregación con la consecuente formación de una red tridimensional (Baeza y col., 2003). Baeza y Pilosof (2001) mostraron que la adición de pequeñas cantidades (0.5 %) de polisacáridos no gelificantes a una solución de β -lactoglobulina (β -lg) al 6 %, concentración en la cual la proteína no gelifica, promueve la gelificación de la misma a temperaturas cercanas y por encima de la de desnaturalización de la proteína a pH neutro (80-88 °C). Sin embargo cada polisacárido (PS) utilizado, goma xántica (X), λ -carragenano (λ -C) y alginato de propilenglicol (PGA), impactó en forma diferente en el

tiempo de gelificación, en las propiedades viscoelásticas de los geles, textura y apariencia. En las mezclas estudiadas no se observó separación de fases macroscópica antes o luego del calentamiento. En la Tabla 1 se muestra el tiempo de gelificación evaluado por reometría dinámica y los parámetros reológicos obtenidos a pH 7 para las diferentes temperaturas de gelificación.

Tabla 1. Tiempo de gelificación (t_{gel}) y viscoelasticidad relativa $\tan \delta$ (G''/G') al finalizar el calentamiento para sistemas β -lg (6%)/PS (0.5%) a pH neutro.

Sistema	T(°C)	t_{gel} (min)	$\tan \delta$
β -lg/ λ -C	80	14.7	0.183
	84	7.44	0.111
	88	6.32	0.097
β -lg/X	80	9.20	0.425
	84	7.70	0.192
	88	6.02	0.119
β -lg/PGA	80	40.42	0.075
	84	15.84	0.071
	88	9.24	0.060

En ensayos realizados con proteína sola al 6 %, no se observó un incremento del módulo elástico respecto al valor de ruido observado inicialmente en las soluciones. El tiempo de gelificación de la β -lg en presencia de λ -carragenano y xántica fue similar y mucho menor que en presencia de PGA. El gel que mostró mayor viscoelasticidad relativa (menor $\tan \delta$) fue el que contenía PGA mientras que el menos viscoelástico fue el gel con goma xántica.

El menor carácter sólido de los geles con xántica se puede observar también visualmente en la Figura 2, en especial a la menor temperatura. Los geles formados con proteína sola en una concentración mayor (no se muestra) eran translúcidos, mientras que los obtenidos en presencia de los polisacáridos fueron en todos los

casos más opacos y con una apariencia diferente de acuerdo al polisacárido utilizado. Se observa que los geles con PGA son más translúcidos. A mayor temperatura de formación los geles presentan una apariencia más firme. Los geles formados a pH 6, mostraron una apariencia totalmente diferente a los geles formados a pH 7 (Figura 2).

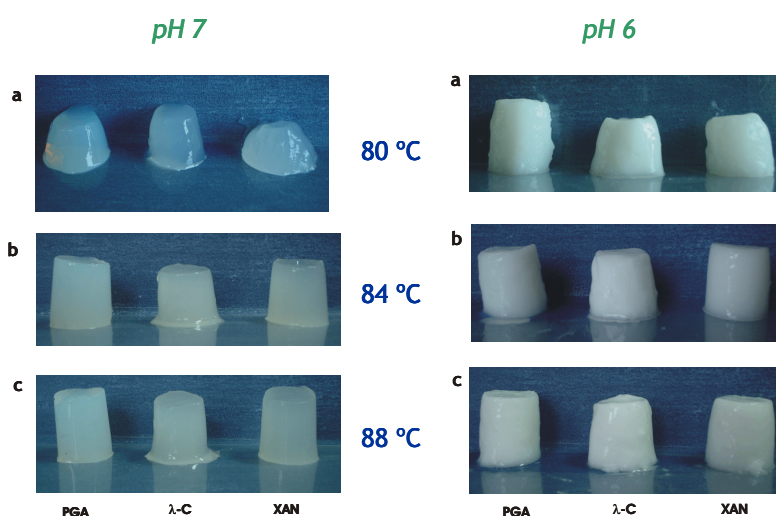


Figura 2. Apariencia de los geles mixtos de β -lg (6%) y polisacáridos (0.5%).

Estos geles fueron totalmente blancos y presentaron un mayor exudado de líquido y una menor dureza. El notable aumento en la agregación de la proteína en presencia de los polisacáridos pudo ser confirmado determinando el tamaño de los agregados por dispersión de luz (Baeza y Pilosof, 2002).

Una causa del incremento en el tamaño de los agregados que llevaría a la formación de la red tridimensional sería un cambio en el tipo de uniones formadas durante el calentamiento.

A pH 7, la gelificación de la β -lg se produce típicamente por la formación de enlaces covalentes del tipo disulfuro, lo que lleva a la formación de agregados lineales que luego se unen por medio de uniones covalentes y no covalentes (hidrofóbicas).

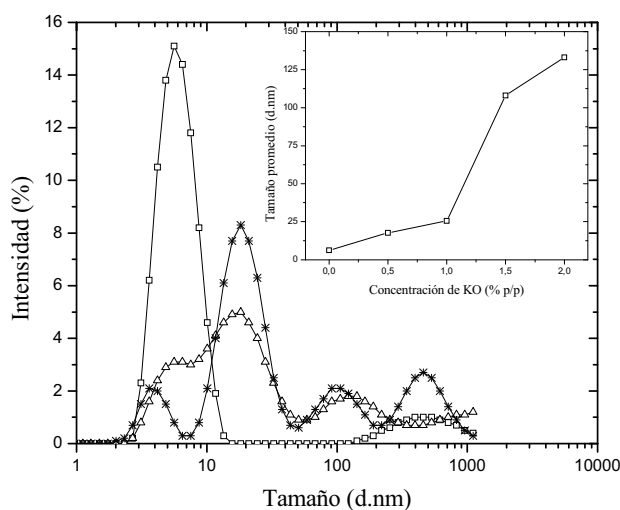


Figura 3. Distribución de tamaño de partícula de los sistemas mixtos: (□) β -Ig 6%, (Δ) β -Ig 6%-KO 1%, y (*) β -Ig 6%-KO 2% a temperatura ambiente. Inserto: efecto de la concentración de PGA sobre el tamaño promedio de agregados.

La presencia de los polisacáridos favorece las interacciones proteína-proteína, y provoca un aumento en las uniones no covalentes entre sus moléculas, lo que lleva a la formación de agregados de mayor tamaño. En la Figura 3 se observa que la adición de PGA (ISP-KO) a soluciones al 6% de β -Ig produce una agregación aún a temperatura ambiente. En la Figura 3 se muestra la distribución de tamaño de partícula de las mezclas indicando cómo a medida que aumenta la concentración de polisacárido en la solución aumenta la formación de agregados. Las distribuciones indican claramente cómo va disminuyendo el pico correspondiente a la forma dimérica de la β -Ig (con máximo de intensidad en el tamaño de 5.6 nm) y van apareciendo picos en tamaños mayores sugiriendo la formación de agregados. Inserto en la Figura 3 se presenta el efecto de la concentración de PGA sobre el tamaño promedio de las partículas, llegando a valores mayores a 100 nm para las concentraciones más altas de PGA en las mezclas.

Durante el calentamiento de estos sistemas mixtos hasta 85°C se producen agregados con un diámetro hidrodinámico promedio de hasta 5600 – 22000 nm respectivamente

(Figura 4). Sin embargo, el diámetro hidrodinámico promedio de los agregados formados por calentamiento hasta 85°C de soluciones de β -lg sola es de entre 23 nm y 750 nm a concentraciones entre 3% y 9%. Se puede concluir entonces, que el PGA influencia la asociación de β -lg a temperatura ambiente y en mucho mayor grado a temperaturas típicas de la gelificación.

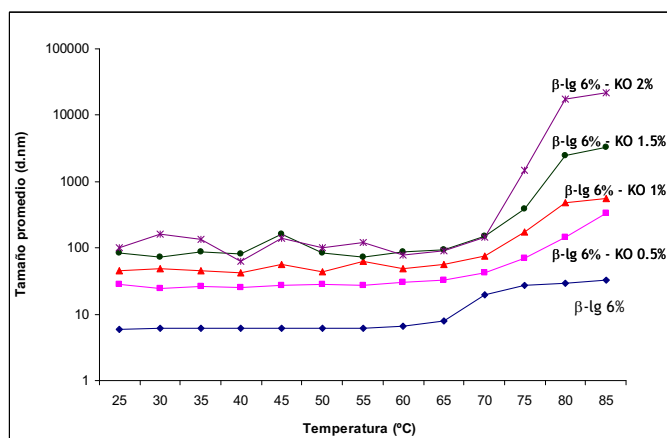


Figura 4. Efecto de la concentración de PGA (ISP-KO) en la agregación de β -lg (6%) inducida por calor.

La dependencia de G' con la frecuencia permite caracterizar los geles de acuerdo al tipo de agregación (Stading y Hermansson, 1990). La dependencia de G' con la frecuencia de las oscilaciones pueden ajustarse mediante la ecuación:

$$\text{Log } (G') = n \cdot \text{Log } (f) + a \quad \text{Ec.1}$$

donde G' es el módulo elástico, f la frecuencia (Hz), n representa la pendiente y a es el valor de G' para el mínimo valor de frecuencia. El parámetro n ha sido descrito en varios trabajos como el indicador del grado de agregación del gel, o como un indicador de la cantidad relativa de agregados físicos en comparación a agregados por uniones covalentes en el gel. En la Figura 5, el gráfico correspondiente al barrido de frecuencias de los geles de β -lg en presencia de los diferentes polisacáridos, se muestra que el valor de n aumenta en el orden $\text{PGA} < \lambda\text{-carragenano} < \text{xántica}$, lo que

indicaría una agregación más grosera y formación de agregados más grandes, del tipo físico predominantemente en la goma xántica, mientras que el gel con PGA presentaría una estructura en donde las cadenas poliméricas se encontrarían formando más uniones covalentes. Así mismo se puede observar que el mayor módulo elástico corresponde al gel conteniendo λ -carragenano.

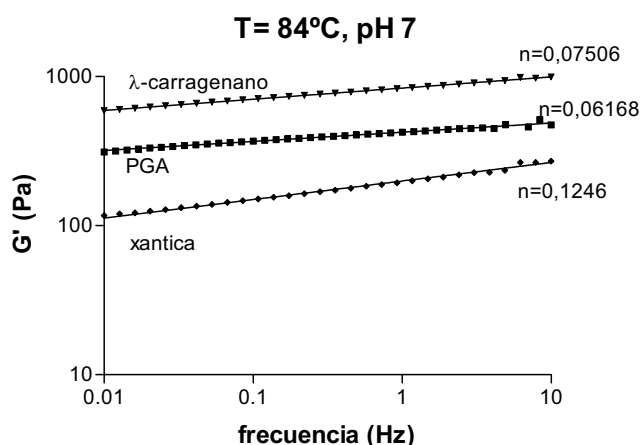


Figura 5. Barrido de frecuencias (0,01-10 Hz) para geles mixtos de β -Ig + PS.

En la Figura 6 se observa la microestructura de los geles formados a 84 °C, a pH 7 y 6 (Baeza y Pilosof, 2001). Las imágenes corresponden a geles de estructura particulada, excepto para el caso del sistema β -Ig-PGA a pH 7 que muestra una estructura lisa y continua. A pH 7 en presencia de λ -carragenano la proteína forma agregados grandes y esféricos de aproximadamente 8 μ m de diámetro y pocas zonas de unión entre los mismos. Las partículas esféricas de entre 2 y 4 μ m de diámetro dispersas en la estructura podrían representar partículas agregadas del polisacárido en una fase separada. Esta inclusión de partículas de menor diámetro no fue observada en los sistemas con xántica donde se observa una estructura densa formada por agregados lisos de forma irregular, con un tamaño de 2 μ m, presentándose estos agregados como fundidos unos con otros.

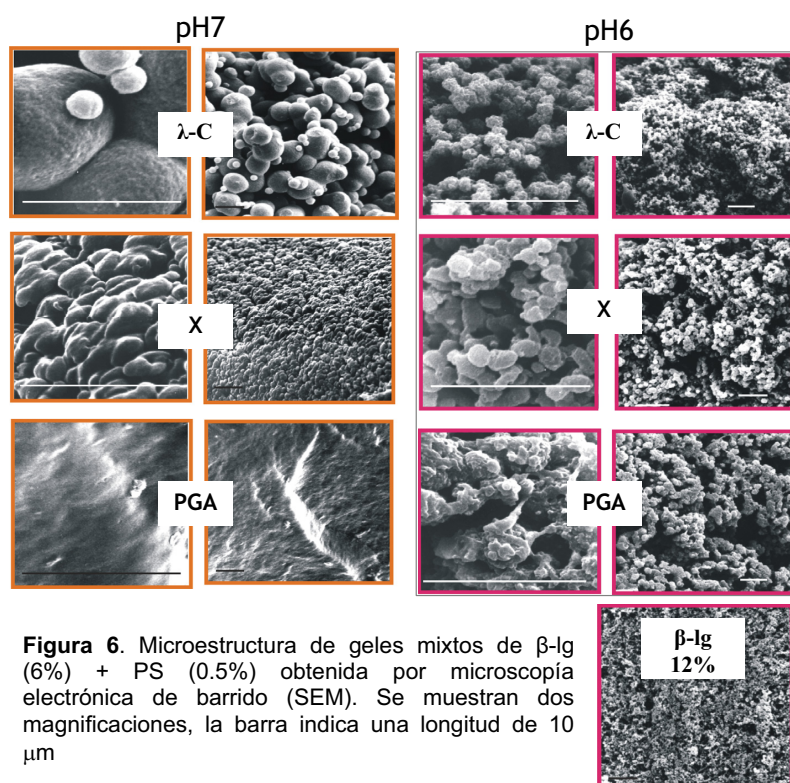


Figura 6. Microestructura de geles mixtos de β -Ig (6%) + PS (0.5%) obtenida por microscopía electrónica de barrido (SEM). Se muestran dos magnificaciones, la barra indica una longitud de 10 μ m

A pH 6 se obtuvieron geles de estructura más regular en presencia de λ -C y goma xántica. Estos geles mostraron una apariencia similar a los geles particulados de β -Ig sola. En los geles con λ -C las partículas o agregados forman gruesas cadenas con una estructura y distribución de poros más regular que lo observado a pH 7. Los agregados se mostraron asociados en grupos esféricos de alrededor de 1 μ m de diámetro, formando luego una cadena de agregados. Los agregados fueron en promedio unas 8 veces más pequeños que los observados a pH 7. La microestructura de los geles β -Ig/Xan a pH 6 indica una reducción en el tamaño de los agregados a la mitad del valor a pH 7, con una forma más esférica y no tan fusionados unos con otros como a pH 7. Las partículas formadas en presencia de PGA a pH 6 muestran una estructura irregular, como escamas en grupos fundidas en una densa estructura. Estos grupos de escamas presentaban zonas de unión no muy extensas entre uno y otro.

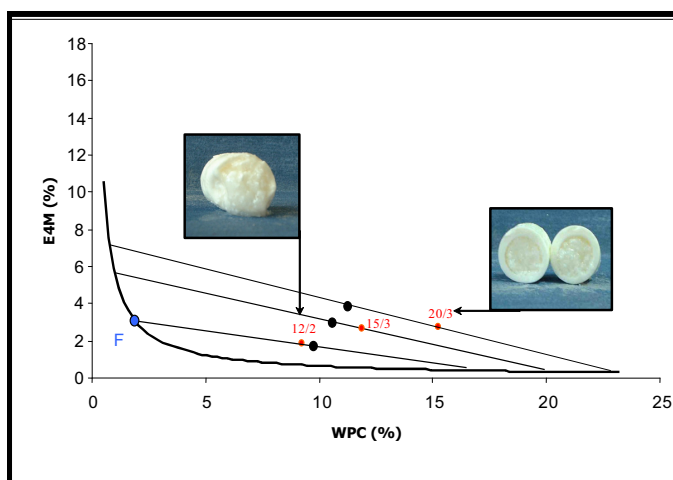


Figura 7. Diagrama de fases mostrando la curva binodal correspondiente al sistema WPC/E4M. ● puntos del diámetro rectilineal; ● relación de concentraciones original de los componentes; ●F umbral de separación de fases. Inserto, geles *core-shell* obtenidos por calentamiento de los sistemas mixtos señalados con las flechas.

Las mezclas de concentrados de proteínas del lactosuero WPC80 con hidroxipropilmetilcelulosa (DowChem.E4M) a pH 7 son sistemas termodinámicamente incompatibles a temperatura ambiente, por lo cual tienden a separarse fácilmente en dos fases. La Figura 7 corresponde al diagrama de fases obtenido para el sistema WPC + E4M a 25°C (Pérez y col., 2006a). Al ocurrir la separación de fases, se obtiene una fase superior rica en E4M y otra inferior rica en WPC. Las cuerdas conectan puntos binodales que representan la composición de las fases coexistentes y los volúmenes medidos de las fases superior e inferior son proporcionales a la longitud de los segmentos que las conforman.

Al ser sometidas estas mezclas a calentamiento tienen lugar una serie de complejos fenómenos, algunos de los cuales pueden ocurrir simultáneamente: a) deshidratación de las moléculas de HPMC y consiguiente exposición de grupos hidrofóbicos susceptibles de agregarse entre sí. Este fenómeno se refleja como una disminución del módulo G' al comienzo del calentamiento de las mezclas; b) agregación/gelificación de HPMC; c) agregación/desnaturalización de WPC; d)

separación de fases. Pérez y col. (2006a) estudiaron la dinámica de gelificación térmica así como la macroestructura de estas mezclas mostrando que existen dos fenómenos competitivos: la separación de fases y la gelificación. Debido a la competencia entre velocidad de gelificación y de separación de fases, se logra obtener geles con una macroestructura muy interesante, de tipo core-shell, a concentraciones de proteína mayores o iguales al 12% y concentración variable de E4M (1 - 4%) (Figura 7). Este tipo de estructura puede encontrar aplicación como sistema de microencapsulamiento o de liberación controlada, en los cuales algún componente activo se particiona entre las fases separadas y puede concentrarse en la fase HPMC, o bien para desarrollar nuevas estructuras y alimentos.

Como se mostró anteriormente, cada polisacárido por sus características propias, presenta distinta incompatibilidad con la proteína generando diferentes agregados proteicos y estructuras en los geles. Así mismo para un dado polisacárido al aumentar su concentración en relación a la proteína, se induce una mayor agregación de la proteína obteniéndose geles cada vez más particulados (Baeza y Pilosof, 2001). Por lo tanto, la selección del polisacárido y de su concentración permite obtener geles de proteínas del lactosuero de características específicas.

2. Propiedades interfaciales y de espumado de mezclas de proteínas del lactosuero y polisacáridos.

Las interacciones entre proteínas y polisacáridos en interfases son de gran importancia para la formación y la estabilidad de espumas y emulsiones, así como para el diseño de películas interfaciales con propiedades específicas.

En los últimos años se ha abordado el estudio de las propiedades interfaciales aire-agua de proteínas del suero lácteo y otras proteínas en presencia de polisacáridos con y sin actividad interfacial (Baeza y col., 2004, 2005; Arbolea y Wilde, 2005; Baeza y col., 2006; Ganzevles y col., 2006; Pérez y col., 2006b, Pérez y col., 2007, Martínez y

col., 2007, Pérez y col, 2008) y su relación con la estabilidad de las espumas en condiciones donde pueden existir fenómenos de volúmenes de exclusión en el seno de la fase (pH 7, concentración de proteína 2% máximo, concentración de polisacárido 0.5% máximo). Los estudios interfaciales realizados en colaboración con el Grupo de Sistemas Dispersos de la Universidad de Sevilla, permitieron determinar la existencia de fenómenos competitivos o cooperativos entre los biopolímeros a nivel de las películas interfaciales y mostraron que aún los polisacáridos sin actividad interfacial tienen efecto a nivel de la interfase proteica, contribuyendo a la estabilización de espumas más allá de su carácter espesante.

Por lo general los polisacáridos debido a su carácter altamente hidrofílico no son activos en las interfases. Un grupo de polisacáridos con actividad interfacial son los ésteres del ácido alginico, alginato de propilenglicol (PGA) que son producidos con una gama de viscosidades y grados de esterificación. Al aumentar el grado de esterificación se reduce el carácter hidrofílico de la molécula lo cual le imparte propiedades interfaciales. La capacidad resultante para reducir la tensión superficial así como aumentar la viscosidad los convierte en agentes estabilizadores y espumantes. La hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) es un derivado de la celulosa que tiene sustituyentes metilos e hidroxipropilos en la estructura principal de anhidroglucosa. Los grupos metilo constituyen zonas altamente hidrofobicas mientras que los grupos hidroxipropilo son más hidrofílicos, aunque ambos lo tornan surfactante.

Debido al carácter tensioactivo, estos polisacáridos pueden competir con las proteínas por las interfases. Se han estudiado las propiedades dinámicas y de equilibrio de las siguientes mezclas proteína + polisacárido: β -Ig + PGA, caseinomacropeptido (GMP) + PGA, concentrado de proteína de suero (WPC80) + HPMC para comprender cómo las características de cada componente y la capacidad formadora de película impacta en las propiedades de las películas mixtas (Baeza y

col., 2004, 2005a; Baeza y col., 2006; Pérez y col., 2006b; Pérez y col., 2007; Pérez y col., 2008).

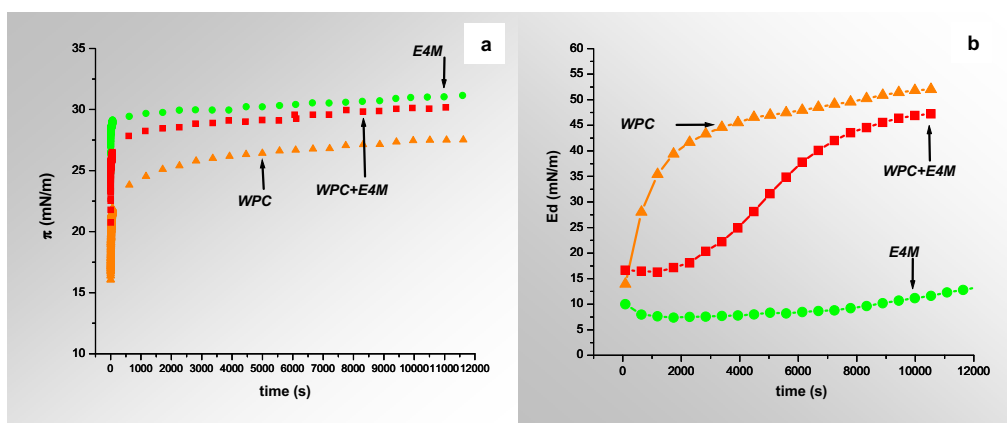


Figura 8. Evolución de la presión superficial π (a) y de la elasticidad dilatacional superficial E_d (b) en el tiempo de las películas mixtas WPC / HPMC (DowChem E4M).

La evolución de la presión superficial (π) así como de las propiedades reológicas de la película interfacial de los componentes solos y de las mezclas se estudiaron en un tensiómetro de gota a 20°C y a pH 7. Dichos estudios se realizaron en concentraciones de proteína y polisacárido en el seno de la fase que permiten la saturación de la interfase (concentración de proteína y polisacárido 1-2 %). Este pH no promueve el complejamiento electrostático entre proteínas y polisacáridos y los sistemas presentan una incompatibilidad limitada (no hay separación macroscópica de fases predominando el fenómeno de volúmenes de exclusión). La presión superficial con el tiempo para mezclas de HPMC con WPC, mostró una conducta competitiva, dominado por HPMC a causa de su actividad superficial excepcionalmente alta (Figura 8). La componente elástica del módulo dilatacional (E_d) de las películas mixtas en tiempos cortos de adsorción fue dominado por el componente que se adsorbe más rápidamente (HPMC). En tiempos largos de adsorción, E_d fue dominado por el componente con el mayor E_d (WPC) (Figura 8). En mezclas de HPMC y proteína de

soja se observó un comportamiento semejante, siendo dominada la elasticidad de la película por HPMC en este caso, quien presentó un Ed mucho mayor que la proteína de soja (Martinez y col., 2007).

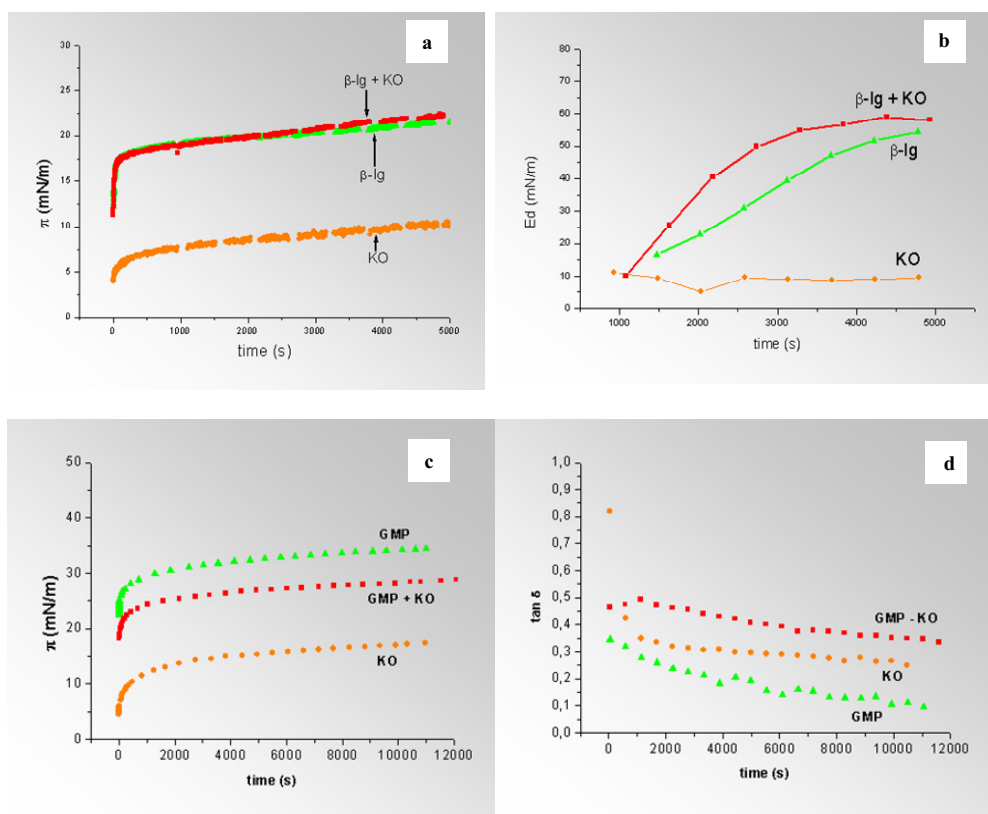


Figura 9. Evolución de la presión superficial (π) en el tiempo de las películas mixtas β -Ig/PGA (ISP-KO) (a); y de GMP/KO (c); evolución de la elasticidad dilatacional de las películas mixtas β -Ig/PGA (ISP-KO) (b) y de la viscoelasticidad relativa de GMP/KO (d).

La presión superficial con el tiempo para mezclas de un polisacárido con poca actividad superficial como el PGA con proteínas como β -Ig o GMP, fue dominado por β -Ig (Figura 9a), pero mostró un valor intermedio entre los componentes solos para GMP (Figura 9c), aunque el GMP es mucho más activo superficialmente que β -Ig. β -Ig también determinó las propiedades elásticas de la película mixta porque formó películas con mejores propiedades de superficie que PGA (Figura 9b). En el caso de

GMP + PGA, donde ambos componentes tuvieron un E_d semejante, se observó que la viscoelasticidad relativa de la película mixta ($\tan \delta$) fue más baja que la de los componentes solos indicando un efecto antagónico (Figura 9d).

Puede concluirse que durante la adsorción competitiva entre polisacáridos y proteínas del lactosuero en concentraciones altas en el seno de la fase, la presión superficial es dominada por el componente que exhibe mayor actividad superficial si este componente también forma películas con un módulo de elasticidad alto. La reología de la película superficial estaría dominada principalmente por el componente que puede formar las películas más viscoelásticas, pero interacciones antagónicas en la superficie pueden alterar esta conducta. El mismo comportamiento se ha observado durante la adsorción competitiva en la interfase agua/aceite (Figura 10).

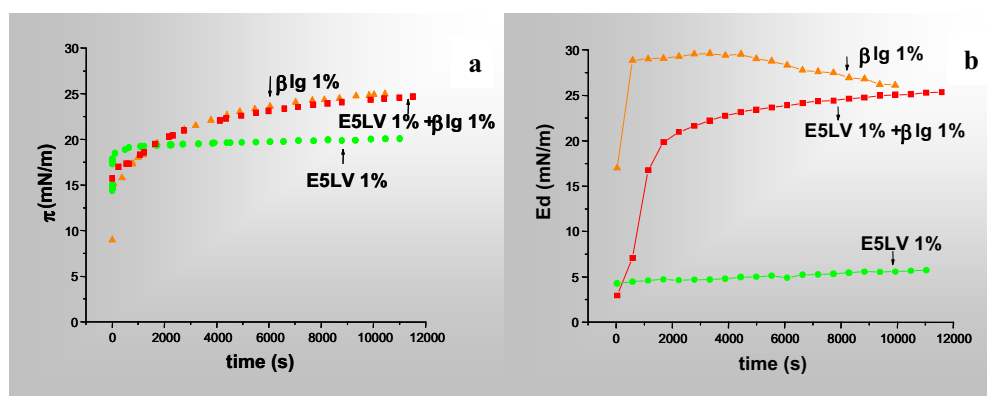


Figura 10. Evolución de la presión superficial (a) y de la elasticidad dilatacional (b) en el tiempo de las películas mixtas β -Ig/HPMC (DowChem E5LV) en la interfase aceite-agua.

Los polisacáridos sin actividad interfacial como la goma xántica o el λ -carragenano tienen una enorme influencia en la interfase aún sin penetrar en la misma, debido a un posible complejamiento sobre la proteína en la monocapa y a fenómenos de limitada incompatibilidad tanto en el seno de la solución como en la interfase (Baeza y col.,

2004; 2005a). En la Figura 11 se muestra el efecto sinérgico que presenta la goma xántica en la presión superficial de la β -lg.

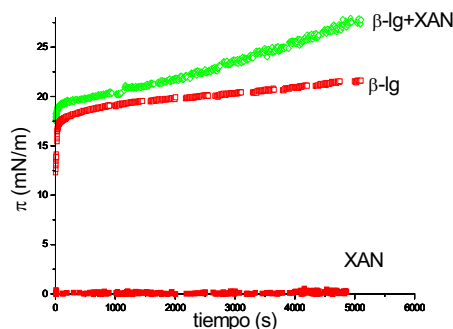


Figura 11. Evolución de la presión superficial (π) en el tiempo de las películas mixtas β -lg / xántica y de los componentes solos Baeza y col., 2005b

En sistemas mixtos con menor concentración de β -lg o WPC (10^{-2} - 10^{-1} %), de acuerdo a la concentración de HPMC o PGA presente en la subfase se puede observar un predominio de la proteína en la presión superficial (Baeza y col., 2006; Pérez y col., 2007). En particular, en condiciones donde ninguno de los dos componentes por sí mismo satura la interfase (por ejemplo, WPC= 10^{-2} y HPMC= 10^{-4} %) no se observa un comportamiento competitivo, si no más bien aditivo o sinérgico, indicando que ambos componentes coexisten en la interfase contribuyendo en forma cooperativa al aumento de la presión superficial. En este caso, sin embargo, la elasticidad dilatacional de las películas mixtas muestra valores menores que los componentes puros señalando que en condiciones de no saturación, la presencia de HPMC interfiere en la agregación interfacial de WPC necesaria para estructurar la interfase (Pérez y col., 2007).

El efecto de los polisacáridos en las propiedades interfaciales de una proteína es complejo por lo cual no se puede predecir en forma simple el comportamiento de mezclas de proteínas y polisacáridos debido a la coexistencia de diferentes fenómenos que se muestran en la Figura 12:

- a) Incompatibilidad entre biopolímeros tanto a nivel de la subfase como de la interfase que promueven una segregación de ambos biopolímeros y un aumento de la concentración efectiva.
- b) Fenómenos competitivos o cooperativos que predominan de acuerdo a la concentración de cada componente en la subfase.
- (c) interacciones específicas de complejamiento a través de ciertas regiones de la molécula del polisacárido y de la proteína que ocurren aún cuando las condiciones de pH no favorezcan la ocurrencia de atracciones electrostáticas netas (pH por encima del isoelectrico).

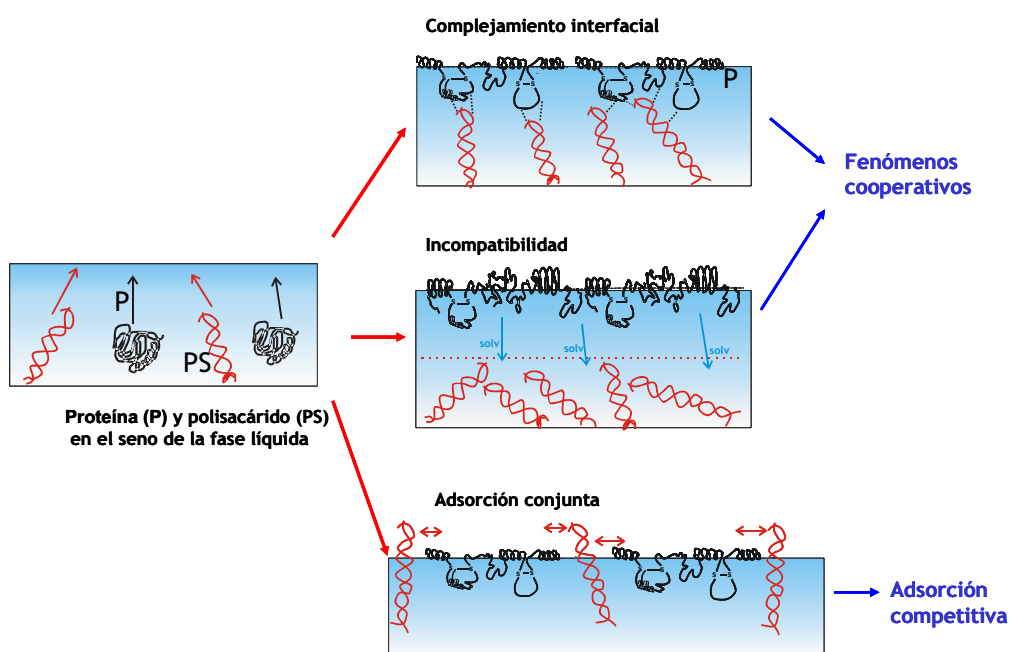


Figura 12. Mecanismos de interacción entre proteínas y polisacáridos en interfases

Los polisacáridos afectan las propiedades de espumado de las proteínas lácteas por influir tanto en las propiedades reológicas del seno de la solución como en las interfaciales. En general, la presencia de un polisacárido disminuye la capacidad de espumado de las proteínas (Figura 13) debido al aumento de viscosidad de la fase

continúa que impide una buena incorporación de aire (Carp y col., 2001), modifica la agregación de las proteínas que estabilizan la interfase (Carp y col., 1999) y aumenta la estabilidad de las espumas (Carp y col., 2004).

La estabilidad de espumas de β -lg /xántica es controlada por la alta viscosidad y el comportamiento parecido a un gel del seno de la solución impartido por este polisacárido que tiene enorme poder espesante. En presencia de polisacáridos de menor viscosidad (PGA o λ -carragenano) las propiedades reológicas interfaciales se hacen más preponderantes y la estabilidad de las espumas es determinada tanto por la viscosidad del seno de la fase como por las propiedades interfaciales. Sin embargo el impacto relativo de cada propiedad sobre la estabilidad de espuma dependería del mecanismo de desestabilización específico y la escala de tiempo relevante (Baeza y col., 2005b).

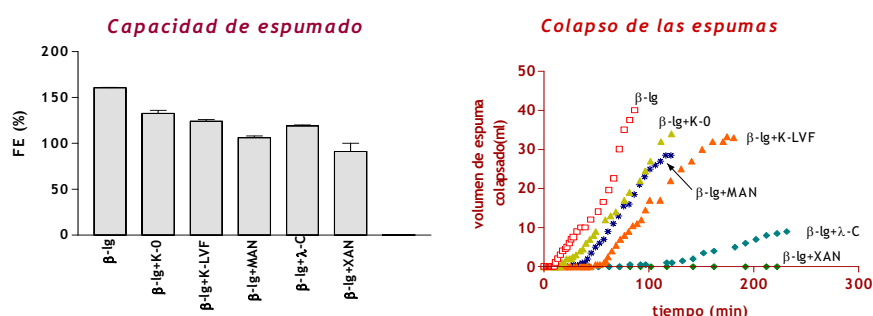


Figura 13. Efecto de diferentes polisacáridos (0.5 %) en la capacidad de espumado (FE) y el colapso de espumas de β -lg (2%).

Agradecimientos

A los Dres, Juan Miguel Rodríguez-Patino y Cecilio Carrera-Sánchez del Grupo de Sistemas Dispersos de la Universidad de Sevilla por haber brindado su conocimiento e infraestructura para la realización de los estudios interfaciales. A la Universidad de Buenos Aires, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET), a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al CYTED (Proyecto 105PI0274) por el financiamiento aportado.

Referencias

- Arbolea, J.C. & Wilde, P.J. (2005). Competitive adsorption of proteins with methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose. *Food Hydrocolloids*, 19, 485-491.
- Baeza, R. & Pilosof, A. M. R. (2001). Mixed Biopolymer gel systems of beta-lactoglobulin and Non Gelling Gums. In: E. Dickinson & R Miller, *Food Colloids-Fundamentals of Formulation* (pp 392-403). Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry
- Baeza, R.I. & Pilosof, A.M.R. (2002). Calorimetric studies of thermal denaturation of b-lactoglobulin in the presence of polysaccharides. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 35, 393-399.
- Baeza, R.I., Carp, D.J., Perez, O. E. & Pilosof, A.M.R. (2002). Effect of proteins on polysaccharide gelling and textural properties. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 35, 741-747
- Baeza, R.; Gugliotta, L & Pilosof, A.M.R. (2003). Gelation of β -lactoglobulin in the presence of propylene glycol alginate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 36, 139-145.
- Baeza, R. I., Carrera-Sánchez, C., Pilosof, A.M.R. & Rodríguez Patino, J.M. (2004). Interactions of polysaccharides with β -lactoglobulin spread monolayers at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 18, 959-966
- Baeza, R., Carrera- Sánchez, C., Pilosof A.M. R. & Rodríguez Patino J.M. (2005a). Interactions of polysaccharides with β -lactoglobulin adsorbed films at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 19, 239-248.
- Baeza, R. I., Carrera-Sánchez, C, Rodríguez-Patino, J. M. & Pilosof A.M.R. (2005b). Interactions between β -lactoglobulin and polysaccharides at the air-water interface and the influence on foam properties. In: E. Dickinson, *Food Colloids-Interactions, microstructure and processing* (pp.301-316). Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.
- Baeza, R., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J. M. & Pilosof, A. M. R. (2006). Adsorption and rheological properties of biopolymers at the air-water interface. *AIChE Journal*, 52 Clave: A., 2627-2638.
- Beaulieu, M., Turgeon, S., & Doublier, J.L. (2001). Rheology, texture and microestructure of whey proteins/low methoxyl pectins mixed gels with added calcium. *International Dairy Journal*, 11, 961-967.

- Capron, I., Nicolai, T. & Durand, D. (1999). Heat induced aggregation of β -lactoglobulin in the presence of κ -carrageenan. *Food Hydrocolloids*, 13, 1-5.
- Carp, D.J., Bartholomai, G.B. & Pilosof, A.M.R. (1999). Electrophoresis studies for determining soy proteins-xanthan gum interactions in foams. *Colloids and Surfaces.B*. 12, 309-316.
- Carp, D.J., Bartholomai, G.B., Relkin, P. & Pilosof, A.M.R. (2001). Effects of denaturation on soy protein-xanthan interactions: comparison of a whipping-rheological and a bubbling method. *Colloids and Surfaces.B*. 21, 163-171.
- Carp, D. J.; Baeza, R. I.; Bartholomai, G. B. & Pilosof A. M. R. (2004). Impact of proteins-kappa-carrageenan interactions on foams properties. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 37, 573-580.
- Doublier, J. L., Launay, B., & Cuvelier, G. (1992). Viscoelastic properties of food gels. In Ananda Rao & Steffe, *Viscoelastic Properties of Foods*, (pp. 371-434). Barking-UK: Elsevier Science.
- Fernandes, P. (1994). Viscoelastic characteristics of whey protein systems at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, 8, 277-285.
- Ganzevles, R.A., Cohen Stuart, M.A., van Vliet, T. & de Jongh, H.H.J. (2006). Use of polysaccharide to control protein adsorption to the air-water interface. *Food Hydrocolloids* 20, 872-878.
- Ledward, D. A. (1994). Protein polysaccharide interactions. In Hettiarachy & Ziegler, *Proteins Functionality in Food Systems* (pp. 225-260). NY-USA: Marcel Dekker,.
- Martinez, K. D., Carrera Sanchez, C., Pizones Ruiz-Henestrosa, V., Rodríguez Patino, J.M. & Pilosof, A.M.R. (2007). Soy protein-polysaccharide interactions at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 21, 804-812.
- Ndi, E., Swanson, B., Barbosa-Cánovas, G., & Luedecke, L. (1996). Rheology and microstructure of β -lactoglobulin/Sodium polypectate gels. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 86-92.
- Ould Eleya, M.M. & Turgeon, S.L. (2000). Rheology of κ -carrageenan and β -lactoglobulin mixed gels. *Food Hydrocolloids*, 14, 29-40.
- Pérez, O. E; Wargon, V. & Pilosof, A.M.R. (2006a). Gelation and structural characteristics of incompatible whey proteins / hydroxypropylmethylcellulose mixtures. *Food Hydrocolloids*., 20: 966-974.
- Pérez, O. E., Carrera-Sánchez, C., Rodríguez-Patino, J.M. & Pilosof, A.M.R. (2006b). Thermodynamic and dynamic characteristics of hydroxypropylmethylcellulose absorbed films at the air-water interface. *Biomacromolecules*., 7: 388-393.

- Pérez, O.E., Carrera-Sánchez, C., Rodríguez-Patino, J.M. & Pilosof, A.M.R. (2007). Adsorption dynamics and surface activity at equilibrium of whey proteins and hydroxypropyl-methyl-cellulose mixtures at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 21, 794-803.
- Pérez, O.E., Carrera-Sánchez, C., Rodríguez-Patino, J.M. & Pilosof, A.M.R. (2008). Dynamics of adsorption of hydroxypropylmethylcellulose at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 22, 387- 402.
- Samant, S. K.; Singhal, R. S.; Kulkarni, P. R. & Rege, D. V. (1993). Protein-polysaccharide interactions: a new approach in food formulations. *International Journal of Food Science and Technology*, 28 (6), 547-562.
- Schmitt, C.; Sánchez, C.; Desobry-Banon, S. & Hardy, J. (1998). Structure and Technofunctional Properties of Protein-Polysaccharide Complexes: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38 (8), 689-753.
- Stading, M.; Hermansson, A.M. (1990). Viscoelastic behaviour of β -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids*, 4, 121- 153.
- Syrbe, A., Fernandes, P. B., Dannenberg, F., Bauer, W., & Klostermeyer, H. (1995). Whey protein + polysaccharide mixtures: polymer incompatibility and its applications. In E. Dickinson & D. Lorient, *Foods Colloids and macromolecules* (pp. 328-339). Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.
- Tolstoguzov, V. B. (1993). Thermodynamic incompatibility of food macromolecules. In Dickinson & Walstra, *Food Colloids and Polymers: Stability, and Mechanical Properties.*, (pp. 94-102). London-UK: The Royal Soc. Chem.
- Tolstoguzov, V. B. (1997). Protein-Polysaccharide Interactions. In: S. Damodaran, & A. Paraf, *Food Proteins and their applications* (pp. 171-198). New York: Marcel Dekker Inc.
- Walkenstrom P., Panighetti, N., Windhab, E., Hermansson, A. M. (1998). Effects of fluid shear and temperature on whey protein gels, pure or mixed with xanthan. *Food Hydrocolloids*, 12, 469-479.
- Zasytkin, D. V., Dumay, E., & Cheftel, J.C. (1996). Pressure and heat-induced gelation of mixed β -lactoglobulin/xanthan solutions. *Food Hydrocolloids*, 10, 203-211.

El presente libro ha sido concebido como el corolario de las actividades del Proyecto de Cooperación Iberoamericana CYTED 105PI0274 que lleva por título "Valorización de subproductos lácteos de interés industrial y para el diseño de alimentos para grupos vulnerables", desarrollado entre 2005 y 2008. El Programa CYTED (Ciencia y Tecnología para el Desarrollo) es el programa de referencia de cooperación en ciencia y tecnología para el desarrollo en Iberoamérica y su objetivo es alcanzar resultados transferibles a los sistemas productivos y a la mejora de la calidad de la vida de la Región Iberoamericana.

El objetivo de este libro es presentar los avances más recientes sobre las propiedades funcionales de componentes lácteos desde el punto de vista físico-químico y de actividad biológica.

Iberoamérica exhibe una larga tradición en la producción y el consumo de productos lácteos. Por lo tanto, la investigación y desarrollo para la valorización de componentes lácteos es la base para la innovación de este dinámico sector. En el presente libro se presentan nuevas estrategias para el aprovechamiento integral del suero de quesería, de componentes proteicos, lactosa y ácidos grasos de la leche, revalorizando su funcionalidad, ya sea como ingredientes de aplicación tecnológica, o por sus propiedades bioactivas. También se presentan avances en la utilización de componentes de la soja y fibra en productos lácteos y en el área de alergenicidad de proteínas lácteas.

Las estrategias abordadas permiten por una parte, la valorización de los subproductos de las industrias lácteas y, por otra, el establecimiento de las bases para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales con actividades biológicas y alimentos para grupos con requerimientos nutricionales especiales.

Los autores que contribuyen en este libro han participado muy comprometidamente en el desarrollo del proyecto CYTED 105PI0274, permitiendo la generación de una vasta red de colaboraciones científicas, el mejoramiento de las capacidades de investigación de los grupos e instituciones participantes y la formación de recursos humanos altamente calificados. A todos ellos nuestro agradecimiento por haber aportado su valiosísima experiencia en los distintos capítulos de este libro.

También manifestamos nuestro agradecimiento al Programa CYTED, por el apoyo brindado en todos estos años a nuestras actividades.

Ana M. R. Pilosof
Coordinador del proyecto CYTED 105PI0274
Javier Fontecha
Isidra Recio