

PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS LÁCTEOS

Rogelio Sánchez-Vega¹ y David R. Sepúlveda-Ahumada²

¹Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Zootecnia y Ecología, Chihuahua, Chihuahua, México.

²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Cuauhtémoc, Cuauhtémoc, Chihuahua, México.

Resumen

Las proteínas de la leche, que representan alrededor del 3,5% del peso total, se dividen en dos grupos: caseínas, insolubles a pH 4,6 y constituidas de cuatro cadenas polipeptídicas (α_0 , α_{S1} , β , y κ -caseínas); y, proteínas del suero que incluyen la β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, albúmina sérica e inmunoglobulinas. Además, en la leche existen enzimas de naturaleza proteica y de importancia tecnológica como la fosfatasa alcalina (indicador de la eficiencia de la pasteurización de la leche). Por otra parte, el consumo frecuente de leche asegura el aporte de aminoácidos esenciales en la dieta, mejora el rendimiento físico y, en el caso de las inmunoglobulinas tienen un efecto inmunoprotector y otros péptidos poseen actividad antitrombótica, antimicrobiana, antioxidante y antihipertensiva (a través de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina). A través de técnicas electroforéticas en gel se han observado proteínas homólogas en varias especies. Existen siete variantes genéticas de caseína α_{S1} , designadas como A, D, B, G, C, F y E. A esto se le llama polimorfismo genético, debido a variaciones en la secuencia de aminoácidos; útil en la clasificación filogenética del ganado y otras especies. La proteína de la leche de vaca es uno de los alérgenos alimentarios más comunes en muchos países desarrollados. Sin embargo, el desarrollo de formulas lácteas hidrolizadas ha permitido enfrentar este problema.

Palabras claves:

Proteínas del suero, caseínas, leche de vaca.

1. Introducción

Las proteínas de la leche son polímeros formados a partir de 20 aminoácidos diferentes. La

secuencia de aminoácidos determinará las propiedades y funciones de cada proteína [1]. En la (**Tabla 1**) se muestra la composición de aminoácidos de las proteínas de la leche.

Aminoácido	Caseína (%)	Proteínas del suero (%)
Ácido aspártico/Asparagina	7,1	10,5
Treonina	4,9	7,0
Serina	6,3	4,8
Ácido glutámico/Glutamina	22,4	17,6
Prolina	11,3	5,9
Glicina	2,7	1,8
Alanina	3,0	4,9
Cisteína	0,34	2,3
Metionina	2,8	1,7
Valina	7,2	5,7
Isoleucina	6,1	6,4
Leucina	9,2	10,3
Tirosina	6,3	2,9
Fenilalanina	5,0	3,1
Triptófano	1,7	2,4
Lisina	8,2	8,7
Histidina	3,1	1,7
Arginina	4,1	2,3

Fuente: Pellegrino, Masotti, Cattaneo, Hogenboom, & Noni, (2013)

Tabla 1. Composición de aminoácidos de las proteínas de la leche.

Como se muestra en la (Figura 1), las proteínas de la leche se dividen en tres grupos: caseínas, las cuales son insolubles a pH 4,6 y representan el 80% del total de las proteínas, y las proteínas del suero, que son proteínas globulares con un punto isoeléctrico de aproximadamente

5,0 y representan el 20% restante. Así, en la leche a pH 4,6 las caseínas precipitan; mientras que las proteínas del suero permanecen solubles [2-4]. Un tercer grupo está representado por las enzimas que, aunque de naturaleza proteica, tienen otras funciones muy específicas.

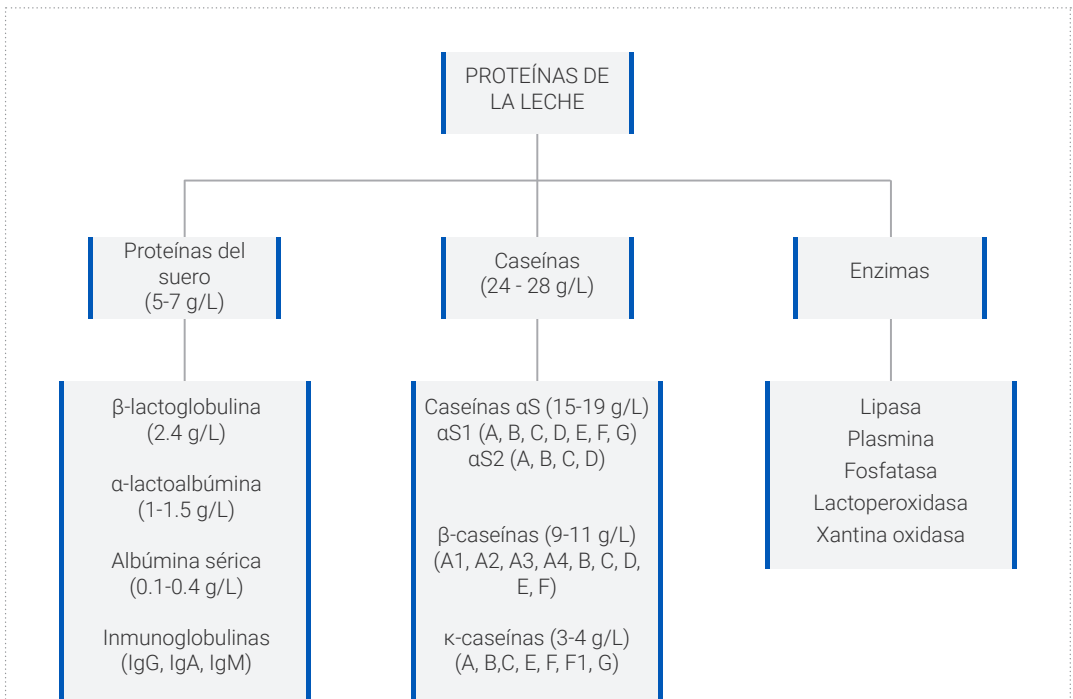


Figura 1. Principales proteínas presentes en la leche.

Familia	Especie	Caseína	Proteínas del suero	Total
Hominidae	<i>H. sapiens</i>	0,4	0,6	1,0
Bovidae	<i>B. primigenius</i>	2,8	0,6	3,4
Bovidae	<i>C. aegagrus</i>	2,5	0,4	2,9
Camelidae	<i>C. ferus</i>	2,9	1,0	3,9
Bovidae	<i>O. orientalis</i>	4,6	0,9	5,5
Leporidae	<i>O. cuniculus</i>	9,3	4,6	13,9
Equidae	<i>E. africanus</i>	1,0	1,0	2,0
Bovidae	<i>B. bubalis</i>	3,5 - 4,2	0,92	4,42 - 5,12
Cercopithecidae	<i>M. mulatta</i>	1,1	0,5	1,6
Ursidae	<i>U. americanus</i>	8,8	5,7	14,5

Fuente: Fox, Uniacke-Lowe, McSweeney, & O'Mahony, (2015) [5].

Tabla 2. Contenido proteico en leches de diferentes mamíferos (g/100 mL).

En la leche de vaca *B. primigenius*, (la de mayor consumo), el contenido proteico representa alrededor del 3,5%. Sin embargo, en la bibliografía se encuentran rangos que van de 2,9 a 6,8 g/100 mL [6,7]. Esta concentración estará en función de la etapa de lactación, estado de salud del animal, especie y raza, alimentación, estación del año, entre otros [5]. Además, la temperatura, pH y fuerza iónica pueden afectar la conformación de las proteínas, alterando sus propiedades, tales como la capacidad de reacción con solutos, asociación-disociación, entre otras [8].

2. Caseínas

La proteína representa ~95% de la materia seca de las micelas de caseína, y el resto son minerales denominados colectivamente como fosfato cálcico coloidal (CCP, por sus siglas en inglés) [5]. De hecho, estas supramoléculas son la principal fuente nutricional de calcio, fosfato y aminoácidos para los neonatos de mamíferos [9]. Las caseínas se definen como aquellas proteínas que precipitan a pH 4,6 a 20°C y que se diferencian por su movilidad electroforética o secuencia de aminoácidos [9]. No es una proteína globular y solo forman α -hélices, son hidrofóbicas, con una carga elevada, contienen fosfato de calcio coloidal, y son termoestables, ya que la leche se puede calentar a su pH natural (~6,7) a 100°C durante 24 horas sin que se produzca coagulación [5,8]. Las caseínas son una mezcla de varios componentes: Caseínas α_{s1} , α_{s2} , β y κ , cuyas características se describen a continuación:

2.1. Caseínas α_{s1}

La familia de caseínas α_{s1} representa aproximadamente el 40% del total de las caseínas en la leche de vaca. Esta proteína está formada de 199 aminoácidos, con 8 de las 16 serinas fosforiladas. La proteína tiene una masa molecular de ~23,0 kDa, de la proteína no fosforilada, y ~23,6

kDa de aquella proteína fosforilada. Su punto isoeléctrico (pI) es ~4,4-4,8 [4].

2.2. Caseínas α_{s2}

La familia caseínas α_{s2} constituye hasta el 10% de la fracción de caseína total en la leche bovina. Está conformada por 207 aminoácidos, resultando en una masa molar de ~24,3 kDa, para el caso de la proteína no fosforilada, y 25,2 kDa en la proteína con la variante 11P. La variante no fosforilada tiene un pI ~8,3. Mientras que el pI de la proteína fosforilada es considerablemente más bajo (~4,9) [4].

2.3. β -caseínas

Las β -caseínas constituyen hasta 35% de las caseínas de la leche de vaca. Contiene 209 aminoácidos y tiene una masa molecular de 23,6 kDa. El pI de la β -caseína A2 no fosforilada se estima en 5,1, disminuyendo a ~4,7 como resultado de la fosforilación. La β -caseína es fuertemente anfipática; los residuos N terminal 1–40 contienen toda la carga neta de la molécula, tienen baja hidrofobicidad y contienen solo 2 residuos Pro. La sección media de la β -caseína (residuos 41–135) contiene poca carga y tiene una hidrofobia moderada, mientras que la sección C-terminal (residuos 136–209), contiene muchos de los residuos apolares y se caracteriza por poca carga y alta hidrofobicidad [5].

2.4. κ -caseínas

La κ -caseína es la más pequeña, ligeramente fosforilada, un pI ~3,5, tiene baja sensibilidad al calcio y es la única caseína que puede estar glicosilada. Consta de 169 aminoácidos y más de la mitad de las moléculas de κ -caseínas no están glicosiladas, pero el resto puede contener hasta 6 glicanos, que pueden ser galactosa (Gal), N-acetilglucosamina (GalNAc) o ácido neuramínico (NeuAc) [4]. La mayoría de la mitad de las moléculas de κ -caseína en la leche bovina a

granel no están glicosiladas, pero el resto puede contener hasta 6 glicanos, en los residuos Thr 121, 131, 133, 142, 145 y 165 [4].

2.5. Micelas de caseína

Las caseínas en la leche se encuentran como estructuras supramoleculares de aproximadamente 150-200 nm, nombradas *micelas* (**Figura 2**), que pueden describirse como coloides de asociación estabilizados estéricamente. El término “micela de caseína” se ha empleado para referirse de forma genérica a las partículas coloidales de proteínas conteniendo fosfato de calcio [9]. En la leche bovina, estas micelas contienen

cuatro diferentes cadenas polipeptídicas: α_{s0} , α_{s1} , β -, y κ -caseínas [10]. La proporción en la que se encuentran estas fracciones proteicas en la leche de vaca son 4:1:3,5:1,5, respectivamente [11]. Para estabilizar estas micelas, las caseínas se unen mediante interacciones proteína-proteína (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y electrostáticas) y por la presencia de nanoclusters de fosfato de calcio coloidal [12]. Uno de los aspectos únicos de las caseínas es la forma en que están presentes en la leche como micelas de caseína. Pueden describirse como supramoléculas conformadas por múltiples entidades moleculares mantenidas unidas y organizadas mediante interacciones no covalentes.

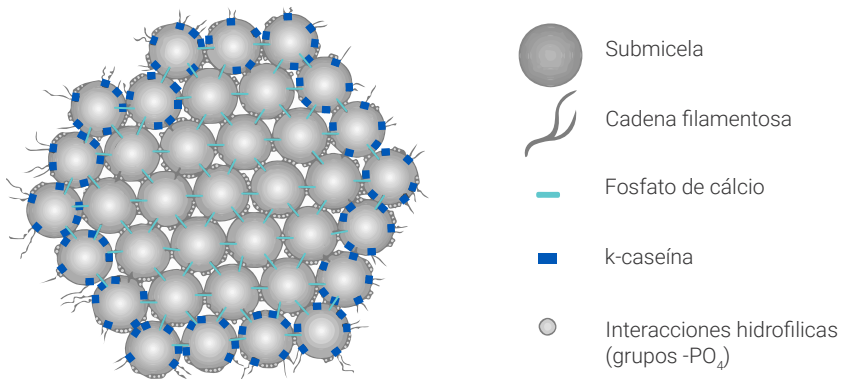


Figura 2. Estructura molecular de una micela de caseína.

3. Proteínas del suero

Las proteínas del suero incluyen un grupo complejo formado por β -lactoglobulina (~55%), α -lactoalbúmina (~20%), albúmina sérica (BSA) (~7%), inmunoglobulinas (~13%) y otras proteínas menores, tales como lactoferrina (~5%) [12]. Además de estas proteínas del suero, se puede obtener caseinomacropéptido a partir de la separación enzimática de las micelas de caseína, el

cual puede representar hasta el 20% del contenido total de las proteínas del suero [13].

3.1. β -lactoglobulina

La β -lactoglobulina es la principal proteína del suero presente en leche de rumiantes (vaca u oveja), aunque está ausente en humanos [14]. En rumiantes y bajo condiciones fisiológicas, la β -lactoglobulina se encuentra como un dímero, mientras que en otras especies aparece como

un monómero. Es una proteína de una elevada hidrofobicidad [1,5], la cual está en función del pH y la fuerza iónica; sin embargo, no precipita cuando la leche se acidifica [10,14]. Además, la concentración de β -Lactoglobulina depende de la especie animal, variaciones estacionales y dieta [14]. Mediante cristalografía de rayos X se ha obtenido la descripción estructural más completa de la β -lactoglobulina. Su estructura consta de nueve hebras de lámina β - antiparalela, ocho de estas dispuestas de tal forma que simulan un barril plano o cónico aplanado, cerrado en un extremo por Trp₁₉. La hebra A se dobla aproximadamente 90° en el residuo 22 para permitirle formar una interacción antiparalela con la hebra H. La novena hebra, I, está en el exterior, y puede formar parte de la interfaz del dímero [14]. El hecho de tener en su composición aminoácidos, aporta valor nutricional, pero las propiedades moleculares, resistencia a ácidos y pepsina [15,16] y la unión a ligandos hacen suponer que existen muchas otras funciones específicas. La β -lactoglobulina se encuentra unida a ácidos grasos, cuando esta se separa bajo condiciones suaves [17,18] y la unión a ligandos aumenta la estabilidad de la proteína [19,20]. La β -lactoglobulina está en mayor cantidad en las proteínas del suero en la leche de vaca, y es relativamente termolábil. Se sospecha que la β -lactoglobulina juega un papel muy importante en el metabolismo del fósforo en la glándula mamaria y unión del retinol [21]. Algunos de los cambios en las propiedades de la leche que ocurren durante el calentamiento se deben a la desnaturalización y agregación de la β -lactoglobulina desnaturalizada con otras proteínas. Por ejemplo, la de un enlace disulfuro entre la β -lactoglobulina y la κ -caseína [22].

3.2. α -lactoalbúmina

La α -lactoalbúmina (α -La) es un componente proteico único del suero de leche en todas las subdivisiones de mamíferos, los euterianos, marsupiales y monotremas [23]. La α -lactoalbúmina de la mayoría de los mamíferos contiene 123 aminoácidos. En el caso de aquellas α -lactoalbüminas de cerdos y conejos, estas tienen un resi-

duo menos en el extremo. En la α -lactoalbúmina bovina (y probablemente en las α -lactoalbüminas de otros rumiantes), una pequeña proporción de alrededor del 10% de las moléculas están glicosiladas, mientras que las α -lactoalbüminas de conejo y rata parecen estar uniformemente glicosiladas en este sitio [24,25]. Se conocen las estructuras de α -lactoalbúmina de varias especies, incluyendo bovinos, caprinos, cobayas, búfalos y humanos [26,27]. La estructura globular de la molécula de α -lactoalbúmina (dimensiones 23 Å x 26 Å x 40 Å) incluye tres α -hélices regulares, dos regiones de hélices 3₁₀, y una pequeña hoja de 3 hebras anti-paralelas plegadas separadas por giros β irregulares. Otra región que es helicoidal en lisozima tiene una estructura menos regular en α -lactoalbúmina [28]. Además, el ión calcio está coordinado por cinco átomos de α -lactoalbúmina. Dos moléculas de agua también coordinan el calcio, formando una bi-pirámide ligeramente distorsionada con grupos ligantes de la proteína [23]. Diversos estudios han relacionado la α -lactoalbúmina en la síntesis de la lactosa. Además, existen preparaciones para el tratamiento del cáncer y los ensayos clínicos iniciales en pacientes con papilomas de la piel y cáncer de vejiga generaron resultados prometedores [29].

3.3. Inmunoglobulinas

La leche tiene una gran variedad de factores que contribuyen a la protección del neonato y la glándula mamaria de diversas enfermedades. Los anticuerpos son un componente importante de la función de resistencia a la enfermedad de las secreciones mamarias. El sistema inmune de los animales está constituido de dos componentes interrelacionados, i) la inmunidad humoral (compuesta de protectores solubles) y ii) la inmunidad celular (compuesta por leucocitos) [30]. Respecto a la inmunidad humoral e inmunoglobulinas (Ig), es importante indicar que la inmunidad de la glándula mamaria mediada por el humo consiste principalmente en anticuerpos en forma de Ig. Los anticuerpos de la leche juegan un papel importante en la protección inmune de la glándula mamaria y el neonato [31-33]. La inmunoglobu-

lina G (IgG) se encuentra solo en forma monomérica en la sangre o la leche, mientras que la IgA y la IgM están presentes en formas poliméricas tanto en la sangre como en la leche [30]. A su vez, en la *inmunidad mediada por células*, la glándula mamaria y los leucocitos de la leche tienen un papel importante en la inmunobiología mamaria [33,34] y en la inmunidad del neonato [31]. La concentración de leucocitos en las secreciones mamarias varía considerablemente según la especie, la etapa de la lactancia y los estados fisiológicos y patológicos de la glándula mamaria [33]. El recuento de células somáticas en la leche de las glándulas mamarias bovinas con infecciones bacterianas puede aumentar rápidamente a las pocas horas de la infección. En la industria láctea, la concentración de leucocitos de la leche (recuento de células somáticas) ha sido la base para reconocer y cuantificar las respuestas inflamatorias de la glándula mamaria. Los leucocitos de la leche consisten principalmente en neutrófilos, macrófagos y linfocitos. La leche también puede contener un pequeño porcentaje de células epiteliales [30]. Al respecto, los linfocitos se dividen en dos tipos distintos, células T y B [33]. Las poblaciones de linfocitos T incluyen varios subtipos, incluidos los linfocitos $\alpha\beta$ y $\gamma\beta$. Los linfocitos T $\gamma\delta$ están asociados con la protección de las superficies epiteliales. Otro linfocito involucrado en las respuestas inmunes del huésped es la célula asesina natural (NK) [33].

El sistema inmune de los mamíferos se desarrolla lentamente y la protección contra la enfermedad depende inicialmente de los anticuerpos maternos. Existe una gama considerable de mecanismos de transporte de inmunidad pasiva de la madre al neonato entre las especies de mamíferos [30]. La presencia de IgG₁ en altas concentraciones en las primeras secreciones mamarias consumidas por el recién nacido, aunque consta de una extensa cantidad de macromoléculas, su duración en el intestino es muy corta. En contraste, el feto humano adquiere IgG durante el último trimestre de gestación por transporte a través de la membrana placentaria [30]. Durante la formación del calostro, las células epiteliales mamarias bovinas absorben rápidamente IgG₁ en su

superficie de membrana basolateral y se pueden observar grandes cantidades de IgG tanto en las células como en el lumen en el momento del transporte máximo justo antes del parto. La unión de IgG₁ a las células epiteliales durante la lactancia también podría ser responsable de las bajas concentraciones de IgG que se encuentran en la leche bovina [30].

3.4. Lactoferrina

Las proteínas de unión al hierro ejercen muchas funciones fisiológicas en los sistemas biológicos. Varias de estas proteínas están involucradas en el transporte de hierro dentro del cuerpo y su almacenamiento en varios compartimentos, al mismo tiempo que protegen contra los efectos prooxidantes del hierro [35]. Al respecto, se ha sugerido que la lactoferrina está involucrada en varios eventos fisiológicos, tales como efectos bacteriostáticos o bactericidas, siendo un componente del sistema inmune, un factor de crecimiento y un potenciador de la absorción de hierro [35].

La lactoferrina es una proteína de cadena sencilla con una masa molecular de alrededor de 80.000 Da. La proteína contiene enlaces disulfuro intramoleculares pero no grupos sulfhidrilo libres. La cadena polipeptídica de lactoferrina consiste de dos lóbulos globulares unidos por una α -hélice sensible al ataque proteolítico [36]. La lactoferrina de la leche humana contiene glicanos poli-N-acetilactosamínicos. La lactoferrina tiene un alto punto isoeléctrico, pH 8,7, y por lo tanto, tiene una tendencia a asociarse con otras moléculas debido a las diferencias de carga [37]. La concentración de lactoferrina en la leche varía ampliamente entre especies. La leche humana y la leche de otros primates, cerdos y ratones son ricas en lactoferrina, mientras que la leche de otras especies, por ejemplo, la vaca y otros rumiantes, son bajas en lactoferrina y la de otros (por ejemplo, la rata) carece por completo de lactoferrina. Las especies que tienen una baja concentración de lactoferrina generalmente tienen un alto nivel de transferrina en su leche [35].

La lactoferrina participa en la regulación del

hierro y en su captación por la mucosa. Debido a su alta concentración en la leche de algunas especies, también se propuso que la lactoferrina participa en el suministro de hierro a la leche [35]. Dado que la lactoferrina afecta a algunas cepas bacterianas, se ha planteado que en la dieta podría afectar la flora bacteriana. Altas concentraciones de lactoferrina se acumulan a partir de los neutrófilos activados durante la inflamación y, por lo tanto, pueden ayudar con la muerte fagocítica [35]. Durante una respuesta inflamatoria, los neutrófilos activados liberan la lactoferrina a la circulación y se ha propuesto que este mayor nivel de lactoferrina circulante es parcialmente responsable de eliminar el hierro de la transferrina y la incorporación al sistema reticuloendotelial [38]. La lactoferrina juega un papel regulador durante las respuestas de citoquinas [39]. A concentraciones inferiores a 10^{-8} M, se ha informado que la lactoferrina es un inhibidor de las respuestas de citoquinas *in vitro*, suprimiendo la liberación de interleucinas 1 y 2 (IL-1, IL-2) y factor de necrosis tumoral (TNF) de cultivos mixtos de linfocitos [40].

4. Propiedades moleculares de las proteínas de la leche

Las seis proteínas principales de la leche son moléculas pequeñas, una característica que contribuye a su estabilidad. Las proteínas del suero están altamente estructuradas, pero las cuatro caseínas carecen de estructuras secundarias estables [35]. Las mediciones físicas clásicas indican que las caseínas no están estructuradas, pero las consideraciones teóricas indican que, en lugar de no estar estructuradas, las caseínas son moléculas muy flexibles y se las conoce como reomórficas [35]. La incapacidad de las caseínas para formar estructuras estables se debe principalmente a su alto contenido de la estructura que rompe el aminoácido, la prolina; la β -caseína es particularmente rica en prolina, con 35 de los 209 residuos. Además, todas las caseínas carecen de enlaces disulfuro intramoleculares, lo que

reduciría la flexibilidad de las moléculas [35].

Las caseínas generalmente se consideran proteínas muy hidrófobas, con la excepción de la β -caseína, debido a su falta de estructuras secundarias y terciarias estables, la mayoría de sus residuos hidrofóbicos están expuestos. La estructura abierta y flexible de las caseínas las hace muy susceptibles a la proteólisis, lo que las hace una rica fuente de aminoácidos. La susceptibilidad a la proteólisis también es importante en la maduración del queso y para la producción de hidrolizados de proteínas. En contraste, las proteínas del suero, especialmente la β -lactoglobulina, en el estado nativo son bastante resistentes a la proteólisis. La mayoría de las proteínas del suero desempeñan una función no nutricional en el intestino y, por lo tanto, la resistencia a la proteólisis es importante. La mayoría de las proteínas de la leche contienen secuencias que, cuando se liberan por proteólisis, son biológicamente activas [35].

Debido a su alta hidrofobicidad, las proteínas de la leche, especialmente las caseínas, tienen una propensión a producir hidrolizados amargos, lo cual es problemático en la producción de productos dietéticos y queso, en los que el amargor puede ser un problema. La falta de estructuras terciarias estables significa que las caseínas no son desnaturizables en sentido estricto y, en consecuencia, son extremadamente estables al calor; el caseinato de sodio, a pH 7, puede soportar el calentamiento a 140°C durante varias horas sin cambios visibles. Esta estabilidad térmica muy alta permite producir productos lácteos esterilizados con calor con muy pocos cambios en la apariencia física. Ningún otro sistema alimentario importante resistiría un calentamiento tan intenso sin sufrir cambios físicos y sensoriales importantes. Las caseínas tienen una tendencia muy fuerte a asociarse; incluso en el caseinato de sodio, que es la forma más soluble de caseína, las moléculas están presentes como agregados de 250-500 kDa [35]. Debido a su alto contenido de grupos fosfato, que se producen en grupos, las caseínas α_{s1} , α_{s2} y β tienen una fuerte tendencia a unirse a iones metálicos, que en el caso de la leche son principalmente iones de calcio [35].

Proteína	mmol/m leche	g/kg leche	g/100 de proteína	Características	Peso Molecular
Caseína	1.170	26	78,5	pI = 4,6	23.192
α _{s1} caseína	440	10,0	31	Fosfoproteína	23.618
α _{s2} caseína	110	2,6	8	Algunas con -S-S-	25.231
β caseína	400	9,3	28	Fosfoproteína	23.986
κ caseína	180	3,3	10	Glicoproteína	19.026
γ caseína	40	0,8	2,4	Parte de la β-caseína	
Proteínas del suero	~320	6,3	19	Solubles a pI	
β-Lactoglobulina	180	3,2	9,8	Contiene cisteína	18.282
α-Lactoalbúmina	90	1,2	3,7	Parte de lactosa-sintasa	14.181
Albumina sérica	6	0,4	1,2		66.277
Proteasa-peptona	~40	0,8	2,4	Fracción heterogénea	
Inmunoglobulinas	~4	0,8	2,4	Glicoproteínas	
IgG1, IgG2		0,65	1,8	Varios tipos	
IgA		0,14	0,4		
IgM		0,05	0,2	Parte es crioglobulina	
Varias		0,8	2,5		
Lactoferrina	~1	0,1		Glicoproteína, liga Fe	
Transferrina	~1	0,1		Glicoproteína, liga Fe	
Proteínas de membrana		0,6	2	Glicoproteínas	

Adaptado de Walstra y cols., 2006 [8]

Tabla 3. Contenido proteico de la leche de vaca.

5. Aspectos nutricionales de la proteína de leche

Desde hace miles de años, en diversas culturas del mundo se ha consumido la leche y derivados como parte de la dieta básica, ya que estos proporcionan nutrientes necesarios para mantener la salud y el bienestar del cuerpo humano. Actualmente, la leche representa uno de los alimentos más completos en la dieta humana. Tanto es así que la leche juega un papel muy importante en la dieta como suplemento nutricional

en todas las edades desde el destete hasta la vejez [22]. La leche contiene una gran variedad de proteínas que deben cumplir con los requerimientos de crecimiento y mantenimiento. Los requerimientos de crecimiento hacen referencia a la necesidad de proteínas durante la lactancia, desarrollo o crecimiento de niños, mujeres lactantes y embarazadas, adultos convalecientes, entrenamiento físico o durante el aumento de la síntesis de proteínas. Mientras que los requerimientos de mantenimiento están asociados a la necesidad de cubrir el recambio diario, principalmente a través de la dieta [41].

Se ha demostrado que las proteínas de la leche y los péptidos bioactivos resultantes de la hidrólisis enzimática, además de su papel nutricional, ayudan en el mantenimiento de diversas funciones fisiológicas y bioquímicas. Las principales acciones incluyen mejoramiento del rendimiento físico, mejora de la absorción de otros nutrientes, prevención de atrofia muscular, manejo de la saciedad y el peso, mejoramiento de la salud cardiovascular, reparación de heridas, actividad antihipertensiva, antitrombótica, antimicrobiana, antioxidante e inmunomoduladora [22]. La mayoría de estas funciones están asociadas a las proteínas y péptidos presentes en la leche. Las proteínas y péptidos con actividades biológicas importantes incluyen inmunoglobulinas, enzimas, inhibidores enzimáticos, factores de crecimiento, hormonas y agentes antibacterianos [22,41].

5.1. Importancia de los productos lácteos en la dieta humana

Las proteínas son importantes para diversas funciones metabólicas humanas porque (i) proporcionan aminoácidos esenciales y péptidos bioactivos (ii) unen y transportan metales y vitaminas y (iii) realizan funciones específicas como anticuerpos y hormonas [42]. La leche de vaca es una fuente de proteínas de muy alto valor biológico [43]. Por ello, es considerada como la mejor fuente proteínica tomando en cuenta los aminoácidos esenciales y la digestibilidad de la proteína [44] (**Tabla 1**). Además, por sus características nutricionales y versatilidad, la leche puede ser transformada en subproductos con diferentes características, tales como quesos, yogurt, crema, mantequilla, entre otros. Por ello, se recomienda incluir a la leche y subproductos en la alimentación diaria.

5.2. Valor nutritivo-biológico de las proteínas y sus requerimientos en la dieta

Aunque existen más de 300 aminoácidos en la naturaleza, solo 20 de ellos se utilizan como unidades estructurales para construir proteínas.

Los aminoácidos se clasifican como nutricionalmente indispensables (IAA), prescindibles (DAA) o condicionalmente indispensables (CIAA) para los humanos [22]. El requerimiento dietético es la cantidad de proteína que se debe suministrar en la dieta para satisfacer la demanda metabólica. La consulta de expertos de la WHO/FAO/UN en el 2007 propusieron un “requerimiento promedio” estimado de 0,66 g de proteína/kg de peso corporal/día para adultos sanos. Teniendo en cuenta la variabilidad interindividual, se espera que un “nivel seguro de ingesta” de 0,83 g de proteína/kg/día satisfaga los requisitos de la mayoría (97,5%) de la población sana. Estos valores deben incrementarse para niños y mujeres embarazadas/lactantes [45]. Las proteínas de la leche son indispensables para garantizar esta ingesta recomendada. Debido a la importancia que tienen las proteínas en la alimentación y para garantizar la ingesta diaria recomendada, la Agencia Francesa de Seguridad Alimentaria (AFSSA, 2007) recomendó el consumo diario de leche y productos lácteos, ya que estos aportan el 20,6% y el 17,2% de las proteínas de la dieta para niños (4–14 años) y adultos, respectivamente.

5.3. Cambios en el valor nutricional de las proteínas

Todos los productos lácteos se someten a tratamientos térmicos durante el procesamiento, con el objetivo de garantizar la seguridad y la estabilidad, así como por muchas otras razones tecnológicas. Este calentamiento provoca reacciones que inducen modificaciones en las proteínas, que pueden afectar la calidad nutricional de la leche. Desde un punto de vista nutricional, los cambios más importantes inducidos por el calor están relacionados con desnaturalización de proteínas, glicosilación, reacciones de β -eliminación, racemización de aminoácidos y formación de enlaces isopeptídicos [46]. Durante la elaboración de quesos, uno de los productos lácteos de mayor consumo a nivel mundial, se pierde gran cantidad de proteínas del suero, las cuales son de un elevado valor biológico. Mientras que cerca del 95% de las caseínas se transfieren de la leche

al queso. Con respecto a esto, se está buscando aplicar tecnologías como ultrafiltración para aumentar la retención de proteínas de suero [2].

6. Hidrolizados de proteínas y péptidos bioactivos

Se ha pensado durante mucho tiempo que la función básica de las proteínas de la leche es proporcionar nitrógeno y aminoácidos esenciales para los mamíferos jóvenes [22]. Sin embargo, las proteínas de la leche intactas tienen una variedad de actividades biológicas. Por ejemplo, las inmunoglobulinas tienen un efecto inmunoprotector, la lactoferrina muestra actividad antibacteriana, mientras que las bajas concentraciones de factores de crecimiento y hormonas, principalmente presentes en el calostro, parecen desempeñar un papel importante en el desarrollo postnatal [47]. Como se muestra en la (Tabla 4), las proteínas de la leche también contienen una

amplia gama de secuencias de péptidos bioactivos, agonistas y antagonistas opioides, péptidos hipotensores potenciales que inhiben la enzima convertidora de angiotensina I (ACE), péptidos de unión mineral, inmunomoduladores, antibacterianos y antitrombóticos [47,48].

6.1. Estructura y actividad biológica

6.1.1. Péptidos opioides

Los péptidos opioides endógenos se derivan de encefalinas, endorfinas y dinorfinas, y actúan como ligandos de receptores opioides. El efecto fisiológico de estos péptidos depende del tipo de receptor [49]. Los péptidos opioides derivados de proteínas de la leche pueden mostrar actividad agonista o antagonista. Los péptidos opioides derivados de caseína exógenos se conocen como casomorfina y/o casoxinas, mientras que los péptidos opioides derivados de proteína de suero se conocen como lactorfinas [50].

Péptido bioactivo	Precursor de la proteína	Bioactividad
Casomorfina	Caseínas α_{s1} y β	Agonista opioide
α -lactorfina	α -lactoalbúmina	Agonista opioide
β -lactorfina	β -lactoglobulina	Agonista opioide
Lactoferroxinas	Lactoferrina	Antagonista opioide
Casoxinas	κ -caseína	Antagonista opioide
Casokininas	Caseínas α_{s1} y β -	Inhibidor de ECA
Lactokininas	α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y albúmina sérica	Inhibidor de ECA
Inmunopéptidos	Caseínas β -, κ - y α_{s1}	Inmunomodulador
Lactoferricina	Lactoferrina	Antimicrobiana
Casocidina	Caseínas α_{s2}	Antimicrobiana
Isracidina	Caseínas α_{s1}	Antimicrobiana
Casoplatelinas	κ -caseína	Antitrombótica
Fosfopéptidos	Caseínas α_{s1} , α_{s2} , β -, y κ -	Mineral de enlace

Fuente: : FitzGerald & Meisel, (2003) [50].

Tabla 4. Péptidos bioactivos derivados de proteínas de la leche.

6.1.2. Péptidos inhibidores de enzima convertidora de angiotensina 1 (ECA)

La enzima convertidora de angiotensina-I (ECA; peptidildipéptido hidrolasa, EC 3.4.25.1) se ha asociado con el sistema de renina angiotensina que regula la presión arterial. La enzima puede aumentar la presión arterial al convertir la angiotensina I en el potente vasoconstrictor, la angiotensina II. La inhibición de la ECA puede ejercer un efecto antihipertensivo como consecuencia de una disminución de la angiotensina II. De hecho, los inhibidores sintéticos potentes de la ECA, como Captopril®, se usan ampliamente en el tratamiento de la hipertensión en humanos [51].

Se han encontrado secuencias de casokinina (inhibidores de péptidos derivados de la caseína de ECA) [52] en caseínas α_{s1} -, β - y κ -, y lactokininas [53] en α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y albúmina sérica bovina. Potentes casokininas incluyen α_{s1} -CN (f 25-27), β -CN (f 74-76), β -CN (f 169-174) y κ -CN (f 108-110) que tienen valores ECA IC_{50} de 2 a 5 μ mol/L. La lactokinina derivada de proteína de suero más potente es β -lactoglobulina (f 142-148) que tiene un valor ECA IC_{50} de 43 μ mol/L [50]. Muchas casokininas y lactokininas potentes contienen un residuo de prolina, lisina o arginina C-terminal. Parece que los péptidos que contienen residuos de aminoácidos hidrofóbicos en la región C-terminal muestran la mayor potencia inhibitoria [50].

6.1.3. Péptidos antimicrobianos

La lactoferrina es una glucoproteína de unión a hierro presente en la mayoría de los fluidos biológicos de mamíferos, incluida la leche. Se ha informado de la existencia de una secuencia antimicrobiana, llamada lactoferricina (f 17-41) cerca del extremo N de lactoferrina, en una región distinta de sus sitios de unión al hierro [54]. La lactoferricina mostró actividad antimicrobiana contra diversas bacterias Gram positivas y negativas, levaduras y hongos filamentosos. Estos péptidos catiónicos matan microorganismos sensibles al aumentar la permeabilidad de la membrana celular [54].

6.1.4. Péptidos antitrombóticos

Las casoplatelinas, péptidos antitrombóticos, se derivan de la parte C terminal (caseinoglicomacromapéptido) de la κ -caseína bovina. Estos péptidos inhiben la agregación de plaquetas activadas por ADP y la unión de la cadena V de fibrinógeno humano a los receptores de fibrinógeno de la superficie de las plaquetas [55]. Los principales péptidos antitrombóticos de κ -caseína corresponden a κ -CN (f 106-116) y fragmentos más pequeños de los mismos [50].

6.1.5. Péptidos inmunomoduladores

Los inmunopéptidos derivados de caseína, incluyendo α_{s1} -CN (f 194-199) y β -CN (f 63-68), (f 193-202) y (f 191-193) estimulan la fagocitosis de los glóbulos rojos de las ovejas por los macrófagos y ejercen un efecto protector contra la infección por *Klebsiella pneumoniae* en ratones después de la administración intravenosa de péptidos [56].

6.2. Importancia fisiológica

Los péptidos bioactivos deben alcanzar sus objetivos para ejercer una respuesta fisiológica específica. Los péptidos opioides derivados de las proteínas de la leche parecen tener importancia fisiológica en los mamíferos, debido a la liberación de casomorfina en la glándula mamaria [57]. La inhibición de la ECA, que se encuentra en diferentes tejidos (plasma, pulmón, riñón, corazón, músculo esquelético, páncreas, cerebro, arterias mamarias, testículos, útero, intestino) puede influir en diferentes sistemas reguladores [50].

Un reciente ensayo de alimentación humana mostró un aumento en la absorción de calcio y zinc después de la incorporación de caseinofosfopéptidos en un alimento infantil a base de arroz [58]. Además, se ha demostrado que los caseinofosfopéptidos se unen al calcio pueden tener un efecto anticariogénico, ya que inhiben las lesiones de caries a través de la recalcificación del esmalte dental [50]. Los péptidos bactericidas pueden ayudar a proteger el tracto intestinal

neonatal y, por lo tanto, respaldar la defensa no inmune del intestino [59]. Todavía no está claro cómo los efectos antibacterianos de los péptidos derivados de alimentos son de importancia fisiológica. Sin embargo, se demostró que un fragmento de lactoferrina de 11 residuos tiene una actividad hemolítica menor mientras que mantiene su actividad antimicrobiana [50].

7. Enzimas presentes en la leche

La mayoría de las enzimas presentes en la leche no tienen un papel fisiológico en la biosíntesis y secreción de la leche, con excepción de la lipoproteína lipasa y la xantina oxidoreductasa [11]. Las enzimas de la leche provienen principalmente del *i*) plasma sanguíneo, *ii*) citoplasma de células secretoras, *iii*) membrana del glóbulo de grasa (esta es probablemente la fuente de la mayoría de las enzimas en la leche), y *iv*) células somáticas (leucocitos), que ingresan a la glándula mamaria desde la sangre hasta la infección bacteriana (mastitis) y, por lo tanto, ingresan a la leche. De forma natural, la leche no contiene sustratos para muchas de las enzimas presentes, mientras que otras se encuentran inactivas debido a condiciones ambientales no óptimas para su actividad, como pH o potencial redox [11]. Sin embargo, muchas otras enzimas tienen funciones específicas; por ejemplo, fosfatasa alcalina, lactoperoxidasa, catalasa, γ -glutamil transferasa, amilasa son importantes para conocer el historial térmico de la leche [11].

7.1. Lipasas

La reacción de la lipasa transforma las grandes lipoproteínas ricas en triglicéridos en lipoproteínas remanentes ricas en colesterol. Este proceso se completa en minutos a unas pocas horas después de que la lipoproteína ha entrado en circulación [60,61]. Algunos de los restos se eliminan de la circulación como tales, pero otros se transforman en lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Estas partículas derivadas remanentes son las

principales lipoproteínas en el plasma en ayunas [60]. Se han encontrado dos lipasas en la leche: colesterol éster hidrolasa y la lipoprotein lipasa. La colesterol éster hidrolasa o también llamada lipasa no específica o lipasa activada por bilis, se activa únicamente cuando la bilis está presente [62].

7.1.1. Lipoprotein lipasa (LPL)

La lipoprotein lipasa (LPL) está presente en diferentes concentraciones en la leche de todos los mamíferos. La LPL puede atraer y acumular lipoproteínas en las superficies celulares [62]. La LPL bovina es un homodímero no covalente de una subunidad glicosilada con 450 residuos de aminoácidos, cinco puentes disulfuro y dos cadenas de oligosacáridos. Las lipasas tienen dos unidades plegables, un dominio principal N-terminal y un dominio C-terminal más pequeño. La forma catalíticamente activa de LPL (bovina) es un homodímero no covalente [63]. La lipasa pancreática relacionada es monomérica en solución [64]. Esto sugiere que el estado dimérico de LPL no es necesario para la actividad catalítica como tal, pero mantiene las subunidades en su conformación activa. La LPL requiere que la apolipoproteína CII (apoCII) actúe sobre las lipoproteínas [65]. La lipasa pancreática requiere otra proteína, la colipasa, para actuar en el intestino [64], pero la lipasa hepática no requiere un activador. Estudios cristalográficos han demostrado que la colipasa interactúa con el dominio C-terminal de la lipasa pancreática [66].

Las estructuras en y alrededor del sitio activo son similares en lipasa pancreática, LPL y lipasa hepática. Las tres enzimas liberan ácidos grasos de las posiciones 1,3 en tri, di y monoglicéridos [67]. Durante la lipólisis de los lípidos de la leche, se liberan preferentemente ácidos grasos de cadena corta y media. Una explicación de esto es debido a que los triglicéridos de cadena más corta se hidrolizan más fácilmente por LPL que los triglicéridos de cadena larga debido a una mayor solubilidad y movilidad en la interfaz emulsión-agua [60].

Tradicionalmente se ha asumido que la fuente principal de LPL en la glándula mamaria son

las células epiteliales alveolares productoras de leche. La microscopía electrónica mostró LPL dentro de las vesículas a lo largo de la ruta secretora, es decir, Golgi, vesículas de condensación, vesículas intracelulares maduras y vesículas secretoras. No se observó LPL asociado con los glóbulos de grasa láctea dentro de las células, por lo que aparentemente, la enzima se secreta con las micelas de caseína. En la glándula mamaria puede producirse cierta transferencia a los glóbulos de grasa de la leche, pero esta asociación probablemente ocurre en gran medida durante la recolección y el almacenamiento de la leche [62]. La actividad de LPL en la leche difiere ampliamente entre especies. Se ha pensado que las especies que producen la lipasa en las células epiteliales mamarias también la liberan en la leche, mientras que otras especies producen la lipasa en un tipo de célula diferente y liberan mucho menos enzima en la leche [61].

7.1.2. Lipólisis de la leche

La leche bovina recién extraída contiene solo pequeñas cantidades de ácidos grasos libres. Cuando los procedimientos de ordeño y almacenamiento son adecuados, la leche puede mantenerse durante varios días con poco desarrollo adicional de ácidos grasos libres [68]. La hidrólisis de tan solo 1-2% de los triglicéridos de la leche a ácidos grasos le da un sabor rancio a la leche, haciendo de la leche no agradable para su consumo [69]. La lipólisis se debe en gran medida a la LPL autóctona de la leche. No obstante, después del almacenamiento prolongado o mal manejo higiénico, las lipasas bacterianas se vuelven importantes [61].

7.2. Proteinasas

La plasmina (fibrinolisisina, fibrinasa, EC 3.4.21.7) es una serina proteinasa similar a la tripsina que está activa a pH 7,5 y 37°C [70,71]. El papel fisiológico de la plasmina es la solubilización de los coágulos de fibrina; es un componente de un sistema complejo que consiste en la enzima activa, plasminógeno, activadores de

plasminógeno (PA) e inhibidores de plasmina y PA. El origen de la plasmina y el plasminógeno en la leche es la sangre de las vacas [72]. El plasminógeno bovino es una glucoproteína que contiene 786 aminoácidos y existe en 2 variantes (91,4 y 89,2 kDa) que difieren en su contenido de carbohidratos. El plasminógeno tiene 5 estructuras características de triple asa y cada una cuenta con un sitio de unión a lisina [71]. La plasmina y el plasminógeno están asociados con las micelas de caseína en la leche. La plasmina se libera de las micelas de caseína a valores de pH inferiores a 4,6 [72].

La actividad enzimática de la plasmina generalmente se mide en una solución de citrato y usando sustratos fluorogénicos [73] o cromogénicos [74]. La relación de plasminógeno a plasmina en la leche se usa con frecuencia como una indicación del grado de activación del plasminógeno [72]. Uno de los factores más importantes que afectan la actividad de la plasmina en la leche es la etapa de lactancia. La actividad de la plasmina disminuye; mientras que el nivel de plasminógeno aumenta después del parto [75]. La actividad de la plasmina también está relacionada con la alimentación o suplementación de concentrados [76], edad del animal [77], raza de ganado [78], entre otras. Sin embargo, las diferencias en la actividad entre razas pueden deberse a diferencias en el contenido de caseína de su leche [77]. La leche mastítica tiene niveles elevados de plasminógeno y plasmina y existe una alta correlación entre el recuento de células somáticas (SCC) de la leche y la actividad de la plasmina [79].

El procesamiento de la leche influye también en la actividad de la plasmina. Al respecto, la pasteurización provoca una mayor actividad de plasmina en la leche, debido a la inactivación de inhibidores de los activadores de plasminógeno, lo que conduce a una mayor activación de plasminógeno [80]. Al aplicar temperaturas más elevadas y en presencia de β -lactoglobulina, la plasmina se desestabiliza mucho más [81].

En los productos lácteos, la plasmina tiene efectos específicos, por ejemplo, en el queso contribuye a la proteólisis durante la madura-

ción [82]. Mientras que en la leche cruda pueden causar la proteólisis de la leche cruda durante el almacenamiento, generando sabores desagradables astringentes [83].

Además de la plasmina en la leche, podemos encontrar proteinasas de células somáticas. En este sentido, en la leche existen tres tipos principales de células somáticas: leucocitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos y linfocitos, que generalmente están en proporciones de 74, 18 y 8%, respectivamente. Durante la mastitis, el recuento de células somáticas (SCC) de la leche aumenta rápidamente, debido a una afluencia masiva de PMN [84]. Debido a una mayor secreción de plasmina en la leche, una parte del SCC está correlacionado con la actividad proteolítica, y el resto probablemente se deba a lisosomas. La proteinasa de células somáticas mejor caracterizada en la leche es la proteinasa aspártica lisosómica, la catepsina D [72].

7.3. Fosfatasa

Las fosfatasa (EC 3.1.3.) catalizan la hidrólisis de monoésteres de fosfato y diésteres de fosfato, respectivamente, utilizando agua como aceptor. Las enzimas de la subclase EC 3.1. co-

rresponden al grupo de las hidrolasas, las cuales actúan sobre enlaces éster e incluyen fosfomonoesterasas (EC 3.1.3.), fosfodiesterasas (EC 3.1.4.) y un grupo específico de fosfodiesterasas, llamadas nucleasas (EC 3.1.11. -EC 3.1.31.). Las fosfomonoesterasas son las fosfohidrolasas más importantes en la leche y se pueden dividir en dos tipos generales, fosfatasa alcalinas (EC 3.1.3.1) y fosfatasa ácidas (EC 3.1.3.2), basadas en el pH óptimo [85].

Entre las fosfatasa, la fosfatasa alcalina (ALP, EC 3.1.3.1) se presenta en todas las leches, aunque su nivel presente varía considerablemente entre especies. En el calostro el nivel de ALP es muy alto, pero se reduce a un mínimo en 1-2 semanas después del parto; mientras que después de la semana 25, alcanza un nivel constante [85]. La ALP es una glicoproteína que contiene ácido siálico. Su actividad se usa como un índice de la eficiencia de la pasteurización HTST, debido a que ALP es ligeramente más resistente al calor que *Mycobacterium tuberculosis*. La prueba ALP es de gran importancia para la salud pública como un medio para vigilar la minuciosidad de la pasteurización o la adición de leche cruda a la leche pasteurizada o productos lácteos [85].

Características	Condiciones	
pH óptimo	Caseína	6,8
	p-Nitrofenilfosfato	9,65 – 10,5
Temperatura óptima	37°C	
K_M	0,69 mM en p-Nitrofenilfosfato	
Activadores	Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+}	
Inhibidores	Quelantes metálicos (EDTA, EGTA, etc.) Ortofosfatos	
Peso molecular	170 kDa	
Estabilidad térmica Valor D a 60°C, pH 9 63°C, pH 9	27,2 min	
	8,3 min	

Fuente: Shakeel-Ur-Rehman et al., (2003) [85].

Tabla 5. Péptidos bioactivos derivados de proteínas de la leche.

La fosfatasa alcalina se concentra en la membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM), donde se asocia con los microsomas (partículas de lipoproteína) de la glándula mamaria. La fosfatasa alcalina es una fosfomonoesterasa con una actividad óptima en el rango de pH 9-10,5. Es un dímero de dos subunidades idénticas de 85 kDa. Las características de la leche ALP se resumen en la (Tabla 5). El valor D para ALP a 60 y 63°C es 27,2 y 8,3 min, respectivamente [85]. Finalmente, la ALP es una de las enzimas más importante desde un punto de vista tecnológico. Leche fluida y sus derivados que muestran actividad de ALP por debajo 1 µg de fenol/mL por el método rápido Schärer, se consideran pasteurizados y seguros para el consumo humano [86].

7.4. Lactoperoxidasa

La lactoperoxidasa se ha asociado a propiedades antimicrobianas de la leche bovina [87]. La enzima consiste de una única cadena peptídica de 612 aminoácidos y una masa molecular de 69.502 Da [88]. Los productos de las reacciones catalizadas por peroxidasa y los mecanismos de las diversas reacciones dependen de la peroxidasa particular, el donador de electrones utilizado, las concentraciones relativas de enzima, peróxido, pH y la temperatura [89]. La lactoperoxidasa está presente en altas concentraciones en la leche bovina. El sistema lactoperoxidasa inhibe el crecimiento y el metabolismo de muchas especies de bacterias en presencia de concentraciones adecuadas de H₂O₂ y SCN⁻ [87].

8. Polimorfismo genético de las proteínas de la leche

Las caseínas son un grupo de proteínas muy heterogéneo, por el hecho de que son productos de genes autosómicos alélicos co-dominantes. Como se muestra en la **Figura 1**, hay siete variantes genéticas de caseínas α 1, cuatro de caseí-

nas α 2, nueve de β -caseínas y seis de κ -caseína. El patrón de herencia de los diversos polimorfos de caseína respalda el concepto de una estrecha vinculación de los cuatro loci genéticos para estas proteínas [90]. Por ello, las variantes genéticas no se observan con frecuencias aleatorias o iguales. Las variantes A y B de la κ -caseína se encuentra con mayor frecuencia [90].

8.1. Métodos de detección de polimorfismo genético

8.1.1. Técnicas electroforéticas

Mediante electroforesis se han detectado y confirmado las variantes genéticas que existen en las proteínas de la leche [91]. El polimorfismo genético se observó claramente en muestras de leche de vaca analizadas mediante electroforesis en papel filtro en tampón de barbitona (pH 8,6). Se produjeron una o dos bandas, o una mezcla de ambas bandas electroforéticamente distintas, que fueron denotadas como β 1 y β 2-lactoglobulinas orden de disminución de la movilidad. Esta nomenclatura fue luego reemplazada por A y B, respectivamente, cuando se descubrió que la síntesis de estos dos tipos de β -lactoglobulina estaba bajo control genético, determinado por dos genes autosómicos alélicos [92,93]. Los métodos electroforéticos para la detección de polimorfismo genético superan con creces cualquier otro método utilizado debido a su simplicidad y facilidad de aplicación para grandes cantidades de muestras [93].

8.2. Frecuencia de polimorfismo genético en especies bovinas

La mayor parte de las investigaciones sobre el polimorfismo genético de las proteínas de la leche se ha realizado en ganado bovino. Las diferentes variantes genéticas de las principales proteínas lácteas identificadas hasta ahora se representan esquemáticamente en la (**Figura 1**). En la actualidad, se han detectado siete variantes

genéticas de caseínas α S1, designadas como A, D, B, G, C, F y E en orden de disminución de la movilidad electroforética. En el primer informe sobre el polimorfismo genético de caseínas α S2 se utilizó la designación A para la variante ya conocida común en las razas europeas y la letra B para una variante recientemente descubierta en ganado bovino y cebú, y la letra C a otra variante observada en yaks del valle de Nepal [94].

8.3. Bases moleculares para el polimorfismo genético en especies bovinas

El polimorfismo genético en las proteínas de la leche se debe a sustituciones de aminoácidos o a la eliminación de una cierta secuencia de aminoácidos a lo largo de la cadena peptídica como consecuencia de mutaciones que causan cambios en la secuencia de pares de bases de la molécula de ADN que constituyen el gen de la proteína. Para identificar la ubicación exacta donde se ha producido la mutación, se debe determinar la estructura primaria de las proteínas. La primera proteína de la leche en ser secuenciada totalmente fue la α -lactoalbúmina, que contiene 123 aminoácidos. Ahora se conoce la secuencia completa de aminoácidos de la segunda proteína de suero, β -lactoglobulina, con 162 aminoácidos [92].

8.3.1. Caseína α_{s1} bovina

La caseína α_{s1} se resolvió en dos bandas electroforéticas distintas que se denominaron como: caseína α_{s1} para el componente principal y caseína α_{s0} para el componente de movimiento más rápido. Aunque las secuencias de aminoácidos de los dos componentes de caseína α_{s1} son idénticas, la caseína α_{s0} tiene una movilidad electroforética más rápida que la caseína α_{s1} debido a la presencia de un grupo fosfato adicional unido al residuo de serina en la posición 41 [95]. Las variantes A, B, D, F, G y H difieren de C y E al tener ácido glutámico en lugar de glicina en la posición 192. La variante D tiene

treonina en lugar de alanina en la posición 53 en la variante C.

8.3.2. Caseína α_{s2} bovina

La separación electroforética en gel mostró la presencia de varias bandas de proteínas de movimiento rápido por delante de las zonas de la β -caseína, las cuales se nombraron como: caseínas α_{s0} -, α_{s1} -, α_{s2} -, α_{s3} -, α_{s4} -, α_{s5} - y α_{s6} , en orden de disminución de movilidad [93]. La denotación α_{s2} de las caseínas se debe a los hallazgos reportados por Brignon y cols. 1973 [96], quienes demostraron de manera concluyente que las caseínas α_s restantes tenían la misma secuencia de aminoácidos, pero diferentes grados de fosforilación [92].

8.3.3. β -caseína bovina

La variante A² de la β -caseína fue la primera en secuenciarse por completo. Usando la secuencia de la β -caseína A² como referencia, las variantes A¹, B y C difieren al tener una histidina en lugar de una prolina en la posición 67. La variante B difiere de A² al tener una arginina en lugar de una serina en la posición 122. La β -caseína C también difiere de la β -caseína A² por un ácido glutámico a la sustitución de lisina en la posición 37 y la ausencia de ácido glutámico en la posición 37 conduce a una serina no fosforilada en la posición 35 en la variante C [93].

8.3.4. κ -caseína bovina

Se identificaron las estructuras primarias de dos variantes genéticas de κ -caseína, A y B. La κ -caseína A difiere de la variante B por la sustitución de treonina por isoleucina en la posición 136 y de ácido aspártico por alanina en la posición 148. La sustitución de arginina en la variante B en la posición 97 da la variante C [97]. En la posición 155, la variante A tiene serina, mientras que la variante E tiene glicina. La sustitución de arginina en las posiciones 10

y 97 en la κ -caseína B por histidina y cisteína, respectivamente, da lugar a las variantes F [98], F^I y G [99], G^E[100]. Debido a que ambas variantes F^I y G^E tienen isoleucina en la posición 136 y alanina en la posición 148, podrían considerarse derivadas de la variante B.

8.3.5. β -lactoglobulina bovina

La β -lactoglobulina contiene 162 aminoácidos y se conocen diez variantes genéticas. Se han identificado las estructuras primarias de β -lactoglobulina A y B. La sustitución de ácido aspártico en la posición 64 y valina en la posición 118 por glicina y alanina, respectivamente, constituyen la diferencia entre las variantes A y B. La sustitución de glutamina en la posición 59 de la variante B por histidina proporciona la variante C, mientras que la sustitución del ácido glutámico en la posición 45 de la variante B por una glutamina da como resultado la variante D [96]. La variante E, que se descubrió en la leche de yak, difiere de la variante B al tener glicina en lugar de ácido glutámico en la posición 158 [101].

8.3.6. α -lactoalbúmina bovina

Brew y cols., 1970 [23] determinaron las secuencias de aminoácidos completas de α -lactoalbúmina A y B. La variante A difiere de B por una única sustitución de glutamina por arginina en la posición 10. Se propuso provisionalmente que la variante C difiera de B por un grupo amida, muy probablemente por la sustitución de asparagina por ácido aspártico [92].

8.4. Distribución de frecuencia de variantes genéticas en otras especies

8.4.1. Especies caprinas

El notable ejemplo de α_{s1} -caseína destaca el polimorfismo de las proteínas de la leche en la cabra. En base a estudios en caseínas de leche de cabra, se dedujo que no había proteínas correspondientes a α_{s1} -caseína. Grosclaude

y cols. 1987 [102] establecieron la existencia de al menos siete alelos, asociados con varias cantidades de α_{s1} -caseína en la leche. También se observaron variaciones cuantitativas de las caseínas α_{s1} en razas italianas [103] (2). Además, Boulanger y cols. 1984 [104] describieron un polimorfismo de α_{s2} -caseína, con dos alelos, α_{s2} -Cn^A y α_{s2} -Cn^B, siendo el primero predominante en las razas Alpine (0,85) y Saanen (0,87). La variante A se subdividió en A y C. La variante B difiere de A al tener Lys en lugar de Glu en la posición 64. La variante C difiere de A por el reemplazo de Lys por Ile en la posición 167 [105].

8.4.2. Especies ovinas

El polimorfismo mejor documentado en las ovejas es el de la β -lactoglobulina, descubierta. Las variantes A y B difieren por una sustitución de Tyr en la variante A por His en la variante B en la posición 20 [106]. Tal diferencia que involucra histidina versus un aminoácido neutro explica por qué el polimorfismo se ve en la electroforesis en gel de almidón a pH 7,2 pero no a pH 8,6. Una variante adicional, β -Lg C, fue encontrada por Erhardt y cols., 1989 [107]. A excepción de la κ -caseína, también se observó polimorfismo en las otras proteínas principales. Además del tipo común de α -lactoalbúmina, (α -La A), la rara variante α -La B se observó en tres razas italianas [108].

8.4.3. Especies porcinas

Los polimorfismos mejor caracterizados de las proteínas de la leche porcina son los de la β -lactoglobulina. Las variantes A y B fueron identificadas a pH alcalino [109]. La variante A fue predominante en los cerdos Duroc (0,95) y la variante B en los cerdos Yorkshire (0,75). Como se demostró que las variantes A y B difieren según una sustitución Ala (B)/Val (A) [110]. Una tercera variante, C, fue encontrada por Bell y cols., 1981 [111].

8.4.4. Especies equinas

El polimorfismo más claramente establecido de la proteína de leche equina es el de una proteí-

na de suero menor, llamada proteína de la zona I y proteína Whey₁, que más tarde se demostró que era β -Lg II, una de las dos β -Lgs de la especie. El primer grupo distinguió cinco variantes (A, B, C, D y E) mientras que el segundo grupo mostró cuatro variantes (A, B, C y D) [92].

8.5. Polimorfismo de proteína de leche como genes marcadores en especies bovinas

Se ha propuesto que varios aspectos que surgen del estudio del polimorfismo genético de las proteínas de la leche tienen aplicaciones prácticas con el fin de mejorar la eficiencia general en diferentes sectores de la industria láctea. Debido a que las diferentes formas polimórficas de las principales proteínas de la leche están controladas por genes autosómicos que se heredan, la selección de vacas para un tipo específico de proteína de leche es factible, y es posible reproducir variantes genéticas específicas deseables.

8.5.1. Producción de leche

No es fácil relacionar el polimorfismo genético de las proteínas de la leche y su producción, debido a varias razones, que incluyen el tamaño de la población, las razas de animales, la frecuencia de las variantes genéticas consideradas, los métodos para medir los rasgos de producción (día de prueba o rendimiento total de la lactancia). Además, el rigor del análisis estadístico para ajustar otros factores importantes que contribuyen a la producción de leche, como edad de la vaca, estación, etapa de lactancia, estado de salud y los efectos de otras variantes genéticas. Existe controversia en la literatura con respecto a la relación entre las variantes genéticas de β -lactoglobulina y la producción de leche. Diversos estudios [112,113] no reportaron relaciones entre las variantes de β -lactoglobulina y la producción de leche. Por el contrario, otros estudios sugirieron una producción superior para las vacas con fenotipo BB [114]. También se ha informado de la asociación de β -lactoglobulina AB con una mayor producción de leche [93].

9. Alergenicidad de proteínas lácteas

Desafortunadamente, el número de personas con alergias alimentarias ha ido en aumento, sobre todo en países desarrollados [115]. Al respecto, el inicio de la alergia a la leche de vaca es generalmente durante la infancia. Se tienen estimaciones de incidencia de 1 a 7,5% en lactantes. La variación parece ser atribuible a las diferencias en los criterios de diagnóstico, el diseño del estudio y la población estudiada [115]. Una de las razones de la mayor proporción de lactantes con alergia a la leche de vaca parece ser la disminución en el número de madres que amamantan a sus hijos [116]. El alimento más seguro para los lactantes, con pocas excepciones, es la leche materna. Las fórmulas de leche de vaca que tienen componentes similares en tipo y proporción a los de la leche materna, son el reemplazo habitual de la leche materna [116]. Diversos estudios han reportado que el 0,5% de los lactantes alimentados exclusivamente con leche materna presentan alergia a la leche [117]. No obstante, estos valores aumentan hasta un 7% en bebés alimentados con fórmula láctea [117]. En años pasados se reportaron casos clínicos de niños con reacciones adversas a fórmulas lácteas, incluyendo hidrolizados de suero [118]. Durante la infancia, una pequeña parte de las proteínas de la leche que son alérgicas pueden ser absorbidas a través de la pared intestinal sin ser digeridas porque el tracto intestinal es inmaduro. Esta inmadurez se considera una causa importante del inicio de la alergia alimentaria en la infancia, aunque el grado de permeabilidad del intestino no está directamente relacionado con el riesgo de desarrollar alergia alimentaria en general. El otro factor principal parece ser el funcionamiento insuficiente del sistema inmune de los lactantes [115].

9.1. Mecanismo de aparición de alergia a la leche

Las reacciones inmunitarias asociadas con alergias alimentarias están mediadas

por anticuerpos y células en una intrincada red de interacciones. Cuando los alérgenos alimentarios, como los de la leche, entran al cuerpo, reaccionan de manera compleja con los órganos del tracto gastrointestinal. Primero, los alérgenos se degradan en el estómago y el intestino en sustancias de bajo peso molecular, como péptidos y aminoácidos. Las sustancias de peso molecular suficientemente bajo no son reconocidas por el sistema inmune y no causan reacciones alérgicas. Aunque en la actualidad no existe un peso molecular definido por debajo del cual los péptidos se consideran no alergénicos, se ha sugerido que, en general, los péptidos con un peso molecular <1.800 Da no son alergénicos [119]

Se distinguen cuatro tipos (tipos I a IV) de reacciones de hipersensibilidad. La gran mayoría de los casos de alergia asociados a la leche involucran reacciones de hipersensibilidad tipo I [120]. Como se muestra en la (Figura 3), el desarrollo de la alergia por el consumo de leche

está regulado por las inmunoglobulinas E (IgE) y se lleva a cabo en dos etapas. La primera fase, "sensibilización" ocurre cuando las proteínas de la leche son pinocitadas por las células presentadoras del antígeno (CPA) y los epitopos (o secuencia a la que se unen los anticuerpos o receptores) de las células B o T. Las células T efectoras Th2 envían señales a las células B a través de interleucina-4 (IL-4) para modificar la producción de IgE específicos de proteína de leche, que luego se unen a los mastocitos (células plasmáticas). En la segunda fase, de "activación", las IgE provocan la desgranulación celular y la liberación de rápida de mediadores inflamatorios, como la histamina, que causan los síntomas alérgicos [115,121].

Los síntomas asociados con la alergia a la leche mediada por IgE incluyen uno o más de manifestaciones cutáneas (eccema, urticaria), gastrointestinales (náuseas, vómitos, diarrea) o manifestaciones respiratorias (rinoconjuntivitis, asma) [121].

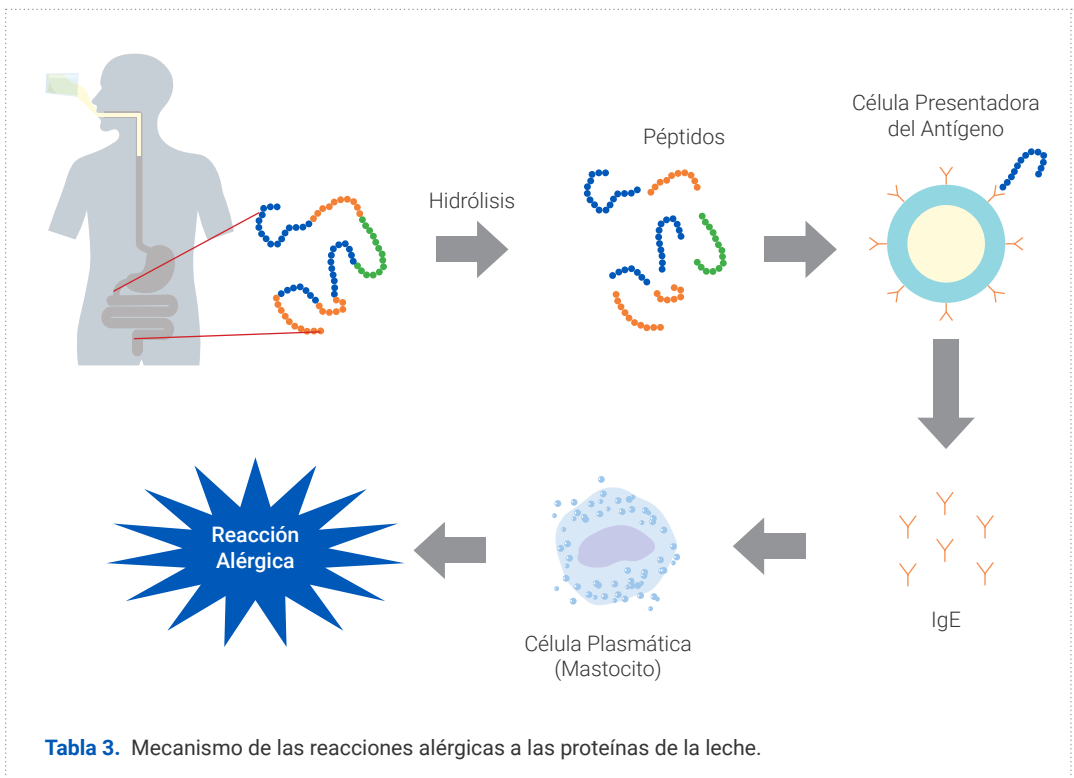


Tabla 3. Mecanismo de las reacciones alérgicas a las proteínas de la leche.

9.2. Alergenicidad de las proteínas de la leche

En casi todos los casos, la causa de la alergia a la leche es una proteína. En base a estudios de alergenidad, la proteína que más frecuentemente provoca respuestas alérgicas es la β -lactoglobulina. La β -lactoglobulina tiene la mayor alergenidad, probablemente porque esta proteína es estable incluso a un pH bajo, lo que la hace resistente a la digestión en el estómago y porque no está presente en la leche materna humana, por lo que es una sustancia extraña para los bebés humanos [115].

10. Conclusión

La leche es uno de los alimentos individuales más completos y complejos, cuya composición varía de una especie a otra. El uso de varios tipos de leche en la dieta humana ofrece su elevada concentración de nutrientes como suplemento en la dieta de diferentes regiones del mundo. La importancia de las proteínas de la leche es ilimitada ya que proporcionan una amplia gama de propiedades funcionales y biológicas que se descubren continuamente y sobre las cuales se acumulan datos científicos. Las proteínas de la leche están conformadas principalmente de caseínas y proteínas de suero. La estructura supramolecular de las micelas de caseína se ha modelado como una red en la que se encuentran los agregados de fosfato de calcio para mantener la integridad de la micela. Una característica de este modelo es que cualquier cambio en la temperatura o el entorno químico ejercerá un cambio global en toda la supramolécula. Un grupo aparte de las proteínas que conforman la leche, pero de gran importancia, son las enzimas, cuyas funciones son significativas para la protección y/o nutrición del recién nacido, estabilidad o deterioro de la leche. Muchas enzimas son importantes en la tecnología láctea como indicadores de calidad.

Las proteínas, además de ser una fuente rica de aminoácidos, contienen una serie de péptidos potencialmente activos que tienen funciones fisiológicas. Se ha documentado la actividad anticancerígena, antimicrobiana, inmunomoduladora, portadora de minerales y antihipertensiva de las proteínas de la leche. Las inmunoglobulinas son esenciales en la transferencia de inmunidad, ya que una alta concentración de inmunoglobulinas en el calostro mejora la resistencia a las enfermedades de los recién nacidos. Algunas proteínas de la leche ya han encontrado aplicaciones en el desarrollo de nuevos alimentos diseñados para proporcionar funciones que promueven la salud, incluida la prevención de enfermedades y la mejora del bienestar de los consumidores. Sin embargo, todavía hace falta evidencia firme de varios roles fisiológicos de péptidos y proteínas de la leche en el ser humano, así como las posibles aplicaciones de estos en algunas terapias específicas. A pesar de los múltiples beneficios del consumo de la leche y sus proteínas, también se encuentran algunos péptidos que están asociados con la aparición de ciertos tipos de alergias. Estos son problemas importantes que deben resolverse en el futuro.

Se ha dilucidado la estructura primaria de la mayoría de las proteínas de la leche, lo que ha permitido, a través de técnicas electroforéticas, el descubrimiento de algunas mutaciones, las cuales se basan en algunas sustituciones de aminoácidos (polimorfismo genético). La presencia de una variante u otra puede tener un efecto en las propiedades de la leche, tales como concentración de caseínas y propiedades de coagulación. Varios estudios han adaptado el polimorfismo genético de las proteínas de la leche como marcadores para la caracterización y diferenciación de la población bovina. A pesar de que las proteínas de la leche han sido bien caracterizadas, aún hay oportunidades de investigación que deberán ser cubiertas.

Referencias

1. Damodaran S. Aminoácidos, péptidos y proteínas. In: Fennema OR, editor. *Química de los Alimentos*. Segunda Ed. Zaragoza, España: Acribia; 2000. p. 383–511.
2. Pellegrino L. y cols. Nutritional Quality of Milk Proteins. In: McSweeney PLH, Fox PF, editors. *Advanced Dairy Chemistry Volume 1A Proteins: Basic Aspects*. Fourth Ed. New York, USA.: Springer; 2013. p. 515–38.
3. Alston-Mills B. Nonprotein nitrogen compounds in bovine milk. In: Jensen RG, editor. *Handbook of Milk Composition*. San Diego, CA, USA: Academic Press; 1995. p. 468–72.
4. Huppertz T. y cols. The caseins: Structure, stability, and functionality. In: Yada R, editor. *Proteins in Food Processing*. Second Ed. Woodhead Publishing; 2018. p. 49–92.
5. Fox PF. y cols. Milk proteins. In: Fox PF, Uniacke-Lowe T, McSweeney PLH, O'Mahony JA, editors. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Second Ed. Springer; 2015. p. 145–239.
6. Çardak A.D. Effects of genetic variants in milk protein on yield and composition of milk from Holstein-Friesian and Simmentaler cows. *South African J. Anim. Sci.* 2005;35:41–7.
7. Czerniawska-Piatkowska E. y cols. A comparison of protein polymorphisms in milk produced by two dairy farms in West Pomerania. *Arch. Anim. Breed.* 2004;47:155–63.
8. Walstra P. y cols. *Dairy Science and Technology*. Second Ed. Walstra P, Wouters JTM, Geurts TJ, editors. Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 2006. 769 p.
9. McMahon DJ, Oommen BS. Casein Micelle Structure, Functions, and Interactions. In: McSweeney PLH, Fox PF, editors. *Advanced Dairy Chemistry Volume 1A Proteins: Basic Aspects*. Fourth Ed. New York, USA.: Springer; 2013. p. 185–209.
10. Walstra P. y cols. Milk components. In: Walstra P, Wouters JTM, Geurts TJ, editors. *Dairy Science & Technology*. Second Ed. Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis; 2006. p. 17–108.
11. Wang J. y cols. Determination of major bovine milk proteins by reversed phase high performance liquid chromatography. *Chinese J. Anal Chem.* 2009;37:1667–70.
12. O'Mahony JA, Fox PF. Milk Proteins: Introduction and Historical Aspects. In: McSweeney PLH, Fox PF, editors. *Advanced Dairy Chemistry Volume 1 Proteins: Basic Aspects*. Fourth Ed. New York, USA.: Springer; 2013. p. 43–85.
13. O'Mahony J.A. y cols. Indigenous enzymes of milk. In: McSweeney PLH, Fox PF, editors. *Advanced Dairy Chemistry Vol 1A Proteins: Basic Aspects*. Fourth Ed. New York, USA.: Springer; 2013. p. 337–85.
14. Sawyer L. β -lactoglobulin. In: Fox PF, McSweeney PLH, editors. *Advanced Dairy Chemistry Volume 1 Part A*. Third Edit. New York, USA.: Kluwer Academic; 2003. p. 319–86.
15. McAlpine AS, Sawyer L. β -Lactoglobulin: a protein drug carrier? *Biochem. Soc. Trans.* 1990;18:879.
16. Guo M.R. y cols. Susceptibility of β -lactoglobulin and sodium caseinate to proteolysis by pepsin and trypsin. *J. Dairy Sci.* 1995;78:2336–44.
17. Diaz de Villegas M.C. y cols. Lipid binding by β -lactoglobulina of cow milk. *Milchwissenschaft.* 1987;42:357–58.
18. Pérez M.D. y cols. Interaction of fatty acids with β -lactoglobulin and albumin from ruminant milk. *J. Biochem.* 1989;106:1094–7.
19. Shimoyamada M. y cols. Stabilities of bovine β -lactoglobulin/retinol or retinoic acid complexes against tryptic hydrolysis, heating and light-induced oxidation. *LWT - Food Sci Technol.* 1996;29:763–6.
20. Creamer L.K. y cols. Secondary structure of bovine β -lactoglobulin B. *Arch. Biochem. Biophys.* 1983;227:98–105.
21. Farrell HM, Thompson MP. β -Lactoglobulin and α -lactalbumin as potential modulators of mammary cellular activity. *Protoplasma.* 1990;159:157–67.
22. Hambraeus L, Lönnerdal B. Nutritional Aspects of Milk Proteins. In: Fox PF, McSweeney PLH, editors. *Advanced Dairy Chemistry Volume 1 Proteins Part B*. Third Edit. New York, USA.: Kluwer Academic; 2003. p. 605–45.
23. Brew K. α -Lactalbumin. In: Fox PF, McSweeney PLH, editors. *Advanced Dairy Chemistry Volume 1 Proteins Part A*. Third Edit. New York, USA.: Kluwer Academic; 2003. p. 387–419.
24. Hopp TP, Woods KR. Primary Structure of Rabbit α -Lactalbumin. *Biochemistry.* 1979;18:5182–91.
25. Prasad R.V. y cols. Amino acid sequence of rat α -Lactalbumin: A unique α -lactalbumin. *Biochemistry.* 1982;21:1479–82.
26. Harata K, Muraki M. X-ray structural evidence for a local helix-loop transition in α -lactalbumin. *J. Biol. Chem.* 1992;267:1419–21.
27. Chandra N. y cols. Structural evidence for the presence of a secondary calcium binding site in human α -lactalbumin. *Biochemistry.* 1998;37:4767–72.
28. Pike ACW. y cols. Crystal structures of guinea-pig, goat and bovine α -lactalbumin highlight the enhanced conformational flexibility of regions that are significant for its action in lactose synthase. *Structure.* 1996;4:691–703.
29. Gustafsson L. y cols. Treatment of skin papillomas with topical α -lactalbumin-oleic acid. *N. Engl. J. Med.* 2004;350:2663–72.
30. Hurley WL. Immunoglobulins in mammary secretions. In: Fox PF, McSweeney PLH, editors. *Advanced Dairy Chemistry Volume 1 Proteins Part A*. Third Edit. New York, USA.: Kluwer Academic; 2003. p. 421–47.
31. Xanthou M. y cols. Human milk and intestinal host

- defense in newborns: an update. *Adv. Pediatr.* 1995;42:171–208.
32. Telemo E, Hanson LA. Antibodies in milk. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 1996;1:243–9.
 33. Sordillo L.M. y cols. Immunobiology of the Mammary Gland. *J. Dairy Sci.* 1997;80:1851–65.
 34. Newby T.J. y cols. Immunological activities of milk. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1982;3:67–94.
 35. Lönnerdal B. Lactoferrin. In: Fox PF, McSweeney PLH, editors. *Advanced Dairy Chemistry Volume 1 Part A. Third Edit.* New York, USA.: Kluwer Academic; 2003. p. 449–66.
 36. Anderson B.F. y cols. Structure of human lactoferrin: Crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1989;209:711–34.
 37. Baker EN, Lindley PF. New perspectives on the structure and function of transferrins. *J. Inorg. Biochem.* 1992;47:147–60.
 38. Van Snick JL, Masson PL. The binding of lactoferrin to mouse peritoneal cells. *J. Exp. Med.* 1976;144:1568–80.
 39. Machnicki M. y cols. Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 in vivo. *Int. J. Exp. Pathol.* 1993;74:433–9.
 40. Crouch SPM. y cols. Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin. *Blood.* 1992;80:235–40.
 41. Aluko RE. *Functional Foods and Nutraceuticals.* First Edit. Rotimi E. Aluko, editor. New York, USA.: Springer; 2012. 163 p.
 42. Borad S.G. y cols. Effect of processing on nutritive values of milk protein. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2017;57:3690–702.
 43. Tomé D. Quantity and quality of proteins: the role of milk protein in meeting amino acid and protein requirements for humans. In: *Symposium of Nutrient Density/Nutritional Aspects of Dairy.* 2010.
 44. Uscanga-Domínguez L.F. y cols. Posición técnica sobre la leche y derivados lácteos en la salud y en la enfermedad del adulto de la Asociación Mexicana de Gastroenterología y la Asociación Mexicana de Gerontología y Geriatria. *Rev. Gastroenterol. Mex.* 2019;84:357–71.
 45. WHO/FAO/UN. Protein and amino acid requirements in human nutrition. *Expert Consultation.* 2007.
 46. Pellegrino L. y cols. Assessment (indices) of heat treatment of milk. In: Fox PF, editor. *Heat-induced Changes in Milk. Special Issue 9501, International Dairy Federation, Brussels;* 1995. p. 419–53.
 47. Schanbacher F.L. y cols. Milk-borne bioactive peptides. *Int. Dairy J.* 1998;8:393–403.
 48. FitzGerald RJ. Potential uses of caseinophosphopeptides. *Int. Dairy J.* 1998;8:451–7.
 49. Höllt V. Multiple endogenous opioid peptides. *Trends Neurosci.* 1983;6:24–6.
 50. FitzGerald RJ, Meisel H. Milk proteins hydrolysates and bioactive peptides. In: Fox PF, McSweeney PLH, editors. *Advanced Dairy Chemistry Volume 1 Proteins Part B. Third Edit.* New York, USA.: Kluwer Academic; 2003. p. 675–98.
 51. Wyvratt MJ, Patchett AA. Recent developments in the design of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Med Res Rev.* 1985;5:483–531.
 52. Meisel H, Schlimme E. Inhibitors of angiotensin-converting-enzyme derived from bovine casein (casokinins). In: Brantl V, Teschemacher H, editors. *β-Casomorphins and related peptides: Recent developments.* VCH, Weinheim; 1994. p. 27–33.
 53. Fitzgerald RJ, Meisel H. Lactokinins: Whey protein-derived ACE inhibitory peptides. *1999;43:165–7.*
 54. Bellamy W. y cols. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta. (BBA)/Protein Struct. Mol.* 1992;1121:130–6.
 55. Bouhallab S. y cols. Tryptic hydrolysis of caseinomacropeptide in membrane reactor: Preparation of bioactive peptides. *Biotechnol. Lett.* 1997;14:805–10.
 56. Migliore-Samour D. y cols. Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation. *J. Dairy Res.* 1989;56:357–62.
 57. Teschemacher H. y cols. Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolym - Pept Sci. Sect.* 1997;43:99–117.
 58. Hansen M. y cols. Casein phosphopeptides improve zinc and calcium absorption from rice-based but not from whole grain infant cereal. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1997;24:56–62.
 59. Schanbacher F.L. y cols. Biology and origin of bioactive peptides in milk. *Livest. Prod. Sci.* 1997;50:105–23.
 60. Olivecrona T. y cols. Lipases in milk. In: Fox PF, McSweeney PLH, editors. *Advanced Dairy Chemistry Volume 1 Proteins Part A. Third Edit.* New York, USA.: Kluwer Academic; 2003. p. 473–94.
 61. Ray P.R. y cols. Lipolysis of milk: a review. *Int J Agric Sci Vet Med.* 2013;1:58–74.
 62. Deeth HC. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. *Int Dairy J.* 2006;16:555–63. Osborne J.C. y cols. Studies on inactivation of lipoprotein lipase: Role of the dimer to monomer dissociation. *Biochemistry.* 1985;24:5606–11.
 63. Chapus C. y cols. Minireview on pancreatic lipase and colipase. *Biochimie.* 1988;70:1223–33.
 64. Olivecrona G, Beisiegel U. Lipid binding of apolipoprotein CII is required for stimulation of lipoprotein lipase activity against apolipoprotein CII-deficient chylomicrons. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997;17:1545–9.
 65. Van Tilbeurgh H. y cols. Structure of the pancreatic lipase-procolipase complex. *Nature.* 1992;359:710–3.
 66. Rojas C. y cols. Comparison of the action of lipoprotein lipase on triacylglycerols and phospholipids when presented in mixed liposomes or in emul-

- sion droplets. *Eur. J. Biochem.* 1991;197:315–21.
67. Downey WK. Risks from pre- and post-manufacture lipolysis. In: *International Dairy Federation Brussels*. 1980. p. 4–18.
 68. Pillay V.T. y cols. Lipolysis in Milk. I. Determination of Free Fatty Acid and Threshold Value for Lipolyzed Flavor Detection. *J. Dairy Sci.* 1980;63:1213–8.
 69. Grufferty MB, Fox PF. Milk alkaline proteinase. *J Dairy Res.* 1988;55:609–30.
 70. Bastian ED, Brown RJ. Plasmin in milk and dairy products: An update. *Int. Dairy J.* 1996;6:435–57.
 71. Kelly AL, McSweeney PLH. Indigenous proteinases in milk. In: Fox PF, McSweeney PLH, editors. *Advanced Dairy Chemistry Volume 1 Proteins Part A*. Third Edit. New York, USA.: Kluwer Academic; 2003. p. 495–521.
 72. Richardson BC, Pearce KN. The determination of plasmin in dairy products. *Dairy Sci Technol.* 1981;16:209–20.
 73. Baldi A. y cols. Changes in plasmin-plasminogen-plasminogen activator system in milk from Italian Friesian herds. *Int. Dairy J.* 1996;6:1045–53.
 74. Benslimane S. y cols. Variation with season and lactation of plasmin and plasminogen concentrations in Montbeliard cows' milk. *J. Dairy Res.* 1990;57:423–35.
 75. O'Brien B. y cols. Effects of stocking density and concentrate supplementation of grazing dairy cows on milk production, composition and processing characteristics. *J. Dairy Res.* 1999;66:165–76.
 76. Bastian E.D. y cols. Plasmin Activity and Milk Coagulation. *J. Dairy Sci.* 1991;74:3677–85.
 77. Richardson BC. Variation of the concentration of plasmin and plasminogen in bovine milk with lactation. *New Zeal. J. Dairy Sci. Technol.* 1983;18:247–52.
 78. Ballou L.U. y cols. Factors Affecting Herd Milk Composition and Milk Plasmin at Four Levels of Somatic Cell Counts. *J. Dairy Sci.* 1995;78:2186–95.
 79. Richardson BC. The proteinases of bovine milk and the effect of pasteurisation on their activity. *New Zeal. J. Dairy Sci. Technol.* 1983;18:233–45.
 80. Kennedy A, Kelly AL. The influence of somatic cell count on the heat stability of bovine milk plasmin activity. *Int. Dairy J.* 1997;7:717–21.
 81. Visser FMV. Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 3. Protein breakdown: Analysis of the soluble nitrogen and amino nitrogen fractions. *Netherlands Milk Dairy J.* 1977;31:210–39.
 82. Harwalkar V.R. y cols. Relation between proteolysis and astringent off-flavor in milk. *J. Dairy Sci.* 1993;76:2521–7.
 83. Ostensson K. Total and differential leukocyte counts, N-acetyl beta-D-glucosaminidase activity, and serum albumin content in foremilk and residual milk during endotoxin-induced mastitis in cows. *Am. J. Vet. Res.* 1993;54:231–8.
 84. Shakeel-Ur-Rehman C.M. y cols. Indigenous phosphatases in milk. In: Fox PF, McSweeney PLH, editors. *Advanced Dairy Chemistry Volume 1 Part A*. Third Edit. New York, USA.: Kluwer Academic; 2003. p. 523–43.
 85. Vega-Warner A.V. y cols. Milk alkaline phosphatase purification and production of polyclonal antibodies. *J. Food Sci.* 1999;64:601–5.
 86. Pruitt K. Lactoperoxidase. In: Fox PF, McSweeney PLH, editors. *Advanced Dairy Chemistry Volume 1 Part A*. Third Edit. New York, USA.: Kluwer Academic; 2003. p. 563–70.
 87. Cals M. y cols. Primary structure of bovine lactoperoxidase, a fourth member of a mammalian heme peroxidase family. *Eur. J. Biochem.* 1991;198:733–9.
 88. Pruitt KM, Kamau DN. The lactoperoxidase systems of bovine and human milk. In: Robinson DS, Eskin NAM, editors. *Oxidative Enzymes in Foods*. London, UK: Elsevier Applied Science; 1991. p. 133–74.
 89. Martin P. y cols. Interspecies comparison of milk proteins: Quantitative variability and molecular diversity. In: McSweeney PLH, Fox PF, editors. *Advanced Dairy Chemistry Volume 1A Proteins: Basic Aspects*. Fourth Edi. New York, USA.: Springer; 2013. p. 387–429.
 90. Martin P. y cols. Genetic polymorphism of milk proteins. In: McSweeney PLH, Fox PF, editors. *Advanced Dairy Chemistry Vol 1A Proteins: Basic Aspects*. Fourth Edi. New York, USA.: Springer; 2013. p. 463–514.
 91. Ng-Kwai-Hang KF, Grosclaude F. Genetic polymorphism of milk proteins. In: Fox PF, McSweeney PLH, editors. *Advanced Dairy Chemistry Volume 1 Proteins Part B*. Third Edit. New York, USA.: Kluwer Academic; 2003. p. 739–816.
 92. Jakob E. Genetic Polymorphism of Milk Proteins. *Mljekarstvo.* 1994;44:197–217.
 93. Grosclaude F, Mahé M-F, Mercier JC, Bonnemaire J, Teissier JH. Polymorphisme des lactoprotéines de bovins Népalais. I. Mise en évidence, chez le yak, et caractérisation biochimique de deux nouveaux variants: β -lactoglobuline D (yak) et caseine as1-E. *Ann Génétique Sélection Anim.* 1976;8:461–79.
 94. Manson W. y cols. Bovine aso Casein; a Phosphorylated Homologue of as1 Casein. *Eur. J. Biochem.* 1993;78:411–7
 95. Brignon C, Dumas BR. Localisation dans la chaîne peptidique de la β lactoglobuline bovine de la substitution Glu/Gln différenciant les variants génétiques B et D. *FEBS Lett [Internet]*. 1973;33:73–6.
 96. Miranda G. y cols. Biochemical characterization of the bovine genetic K-casein C and E variants. *Anim. Genet.* 1993;24:27–31.
 97. Ikonen T. y cols. Allele frequencies of the ma-

- for milk proteins in the Finnish Ayrshire and detection of a new K-casein variant. *Anim. Genet.* 1996;27:179–81.
98. Erhardt G. Detection of a new k-casein variant in milk of Pinzgauer cattle. *Anim Genet.* 1996;27:105–8.
 99. Prinzenberg E-M. y cols. Molecular genetic characterization of new bovine kappa-casein alleles CSN3F and CSN3G and genotyping by PCR-RFLP. *Anim. Genet.* 1996;27:347–9.
 100. Grosclaude F. y cols. Lactoprotéines bovinés. *Ann. Génétique Sélection Anim.* 1976;8:481–91.
 101. Grosclaude F. y cols. A Mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat α 1-casein. *Genet. Sel. Evol.* 1987;19:399–412.
 102. Ambrosoli R. y cols. Content of α 1-casein and coagulation properties in goat milk. *J. Dairy Sci.* 1988;71:24–8.
 103. Boulanger A. y cols. Polymorphisme des caséines α S1 et α S2-de la chèvre. *Genet. Sel. Evol.* 1984;16:157–76.
 104. Bouniol C. y cols. Biochemical and genetic analysis of variant C of caprine α 2-casein (*Capra hircus*). *Anim. Genet.* 1994;25:173–7.
 105. Gaye P. y cols. Ovine β -lactoglobulin messenger RNA: Nucleotide sequence and mRNA levels during functional differentiation of the mammary gland. *Biochimie.* 1986;68:1097–107.
 106. Erhardt G. y cols. Isolation and complete primary sequence of a new ovine wild-type β -lactoglobulin C. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* 1989;370:757–62.
 107. Chiofalo L, Micari P. Attuali conoscenze sulle varianti delle proteine del latte nelle popolazioni ovine allevate in Sicilia. Osservazioni sperimentali. *Sci e Tec Latt Casearia.* 1987;38:10–4.
 108. Kraeling RR, Gerrits RJ. Polymorphism of a Protein of Sow's Whey. *J. Dairy Sci.* 1969;52:2036–8.
 109. Kalan E.B. y cols. Isolation and partial characterization of a polymorphic swine whey protein. *Int. J. Biochem.* 1971;2:232–44.
 110. Bell K. y cols. Porcine β -lactoglobulin A and C. *Mol. Cell Biochem.* 1981;35:103–11.
 111. McLean D.M. y cols. Effects of milk protein genetic variants and composition on heat stability of milk. *J. Dairy Res.* 1984;51:531–46.
 112. Ng-Kwai-Hang K.F. y cols. Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat, and protein production by dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 1984;67:835–40.
 113. Jairam BT, Nair PG. Genetic polymorphism of milk proteins and economic characters in dairy animals. *Indian J. Dairy Sci.* 1983;47:435–7.
 114. Kaminogawa S, Totsuka M. Allergenicity of milk proteins. In: Fox PF, McSweeney PLH, editors. *Advanced Dairy Chemistry Volume 1 Part B.* Third Edit. New York, USA.: Kluwer Academic; 2003. p. 647–74.
 115. Savilahti E. Cow's milk allergy. *Allergy.* 1981;36:73–88.
 116. Bahna SL, Heiner DC. Allergies to Milk. Bahna SL, Heiner DC, editors. Grune & Stratton, Inc.; 1980.
 117. Hill D.J. y cols. Challenge confirmation of late-onset reactions to extensively hydrolyzed formulas in infants with multiple food protein intolerance. *J Allergy Clin Immunol.* 1995;96:386–94.
 118. Businco L. y cols. Prevention and management of food allergy. *Acta Paediatr. Int. J. Paediatr. Suppl.* 1999;88:104–9.
 119. Bruijnzeel-Koomen C. y cols. Adverse reactions to food. European Academy of Allergology and Clinical Immunology Subcommittee. *Allergy.* 1995;50:623–35.
 120. Crittenden RG, Bennett LE. Cow's milk allergy: A complex disorder. *J Am Coll Nutr.* 2005;24:582S-91S.