

# ARTÍCULOS DE REVISIÓN REVIEW ARTICLES

---

## Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales

### *Bioactive milk peptides and proteins*

BARÓ L<sup>1</sup>, JIMÉNEZ J<sup>1</sup>, MARTÍNEZ-FÉREZ A<sup>2</sup> Y BOUZA JJ<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Puleva Biotech S.A. Camino de Purchil 66, 18004 Granada (España)

<sup>2</sup> Dpto. Ingeniería Química, Universidad de Granada

E-mail: Ibaro@puleva.es

### RESUMEN

La fracción proteica de la leche contiene un gran número de compuestos biológicamente activos. Además de las proteínas de la leche, caseínas y proteínas del suero lácteo, existen también pequeñas cantidades de otras proteínas y péptidos. Estos péptidos, que son inactivos dentro de la secuencia de la proteína nativa, pueden ser liberados por hidrólisis enzimática, por ejemplo, durante la digestión gastrointestinal o durante el procesado del alimento. Estos péptidos bioactivos procedentes de proteínas lácteas presentan una actividad moduladora de numerosos procesos metabólicos del organismo. Asimismo, las proteínas del suero lácteo representan una mezcla variada de proteínas secretadas, tales como  $\alpha$ -lactoalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina, lactoferrina, lactoperoxidasa, inmunoglobulinas, glicomacropéptido y una gran cantidad de factores de crecimiento. Estas proteínas tienen una serie de efectos biológicos, que van desde un efecto anticancerígeno hasta efectos en la función digestiva.

PALABRAS CLAVE: Leche. Proteínas. Péptidos

### ABSTRACT

*Milk protein fraction contains many biologically active compounds. Besides milk proteins, caseins, and milk whey proteins, it also contains low amounts of other proteins and peptides. These peptides, which are inactive within the sequence of the native protein, can be released by enzymatic hydrolysis, for example during gastrointestinal digestion, or during food processing. These bioactive peptides from milk proteins are potential modulators of several metabolic processes in the body. Moreover, milk whey proteins are a varied mixture of secreted proteins, such as  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, lactoferrin, lactoperoxidase, immunoglobulins, glycomacropptides and a large amount of growth factors. These proteins have some biological effects, ranging from an anticarcinogenic effect to effects on the digestive function.*

KEY WORDS: Milk. Proteins. Peptides

### PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Las proteínas de la dieta aportan los aminoácidos necesarios para el desarrollo y mantenimiento de células y tejidos de nuestro organismo. Como consecuencia de la digestión de las proteínas, además de aminoácidos libres, se liberan péptidos, que son cadenas con distintos números de aminoácidos. En los últimos años existe un creciente interés por determinados fragmentos específicos de las proteínas de la dieta

### BIOACTIVE PEPTIDES

Diet proteins supply the required aminoacids for the development and maintenance of the cells and tissues of the organism. As a result of protein digestion, besides free aminoacids, peptides, that is, chains of different numbers of aminoacids, are also released. Lately there has been an increasing interest in some specific proteic fragments present in the diet that, besides their nutritional value, have a biological effect, as

que tienen una actividad biológica, regulando procesos fisiológicos, además de su valor nutricional. La literatura científica evidencia que estos péptidos bioactivos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, pudiendo ejercer funciones específicas a nivel local, tracto gastrointestinal, y a nivel sistémico. Dentro de estas actividades, los péptidos bioactivos podrían alterar el metabolismo celular y actuar como vasoreguladores, factores de crecimiento, inductores hormonales y neurotransmisores<sup>1</sup>

### *Origen de las péptidos bioactivos*

Toda fuente de proteína alimentaria es susceptible de aportar péptidos funcionales, de forma que aparte de la leche humana y de vaca, que son los más estudiados, se han aislado péptidos a partir de hidrolizados enzimáticos de proteínas muy diversas: sardina, maíz, soja, gelatina...<sup>2</sup>. En la bibliografía podemos encontrar un gran número de artículos relacionados con los aspectos estructurales, fisiológicos y analíticos de los péptidos bioactivos de la leche humana y de vaca. La gran diversidad de péptidos encontrados en ambas leches viene determinado por la variabilidad de las proteínas de una especie animal respecto de la otra. Por ejemplo, la caseína de la leche de vaca está formada por caseína  $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2,  $\beta$  y  $\kappa$ , mientras que la caseína humana contiene sobre todo caseína  $\beta$  y un poco de caseína  $\kappa$ . La caseína parece ser la mayor fuente de estos péptidos, pero las proteínas del suero también contienen fragmentos con actividad biológica. En la tabla 1 se reflejan las principales péptidos bioactivos obtenidos por hidrólisis de las proteínas de leche humana y de vaca. Estos péptidos bioactivos se han obtenido mediante digestiones *in vitro*, con enzimas proteolíticas tanto de origen animal como microbiano, e *in vivo*, por digestión de la proteína precursora.

Hoy en día, existen diferentes fórmulas nutricionales que contienen péptidos, pero el tipo y cantidad de los mismos varía de unas a otras dependiendo de la fuente de proteica utilizada (caseína, lactoalbúmina, soja, carne) y del grado y tipo de hidrólisis enzimática empleada. Prueba de la importancia de estos péptidos son los distintos efectos fisiológicos obtenidos variando la fuente proteica. Así se han obtenido mejores

regulators of physiological processes. Scientific works show that these bioactive peptides can go through the intestinal epithelium, and reach peripheral tissues through systemic circulation with the ability of performing specific functions at a local, gastrointestinal tract, and systemic level. Within these activities, bioactive peptides may modify cell metabolism and act as vasoregulators, growth factors, hormonal inductors, and neurotransmitters<sup>1</sup>

### *The Origin of Bioactive Peptides*

All kinds of nutritive protein sources may supply functional peptides. Besides human and cow milk, which are those most studied, other peptides, such as those of the sardine, corn, soya, jelly, etc, have also been isolated from enzymatic hydrolysates<sup>2</sup>

Many articles connected with the structural, physiological, and analytical aspects of bioactive peptides in human and cow milk, can be found in the bibliography. The large amount of peptides found in both of these milks is determined by the variability of proteins in one animal species compared to another. For example, casein present in cow milk consists of  $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2,  $\beta$  and  $\kappa_1$ -casein, while casein present in human milk contains mostly  $\beta$ -casein and some  $\kappa_1$ -casein. Casein seems to be the highest source of these peptides, but whey proteins also contain fragments that are biologically active. Table 1 shows the main bioactive peptides obtained through human and cow milk protein hydrolysis. These bioactive peptides have been obtained through *in vitro* digestion, with proteolytic enzymes, either with animal or microbial origin, and *in vivo* through the digestion of the precursor protein.

Nowadays, there are several nutritional formulas containing peptides, but the type and quantity of these peptides depend on the protein source used (casein, lactalbumin, soya, meat) and the grade and sort of enzymatic hydrolysis used. The importance of these peptides is based on the different physiological effects, which can be obtained when varying the proteic source. In this way, better immune responses have been obtained in mice fed on lactalbumin hydrolysates than in those fed on casein<sup>3</sup>. At the same time better immune responses were obtained in mice fed on casein than in those fed on legume proteins<sup>4</sup>, and

respuestas inmunológicas en ratones alimentados con hidrolizados de lactoalbúmina que de caseína<sup>3</sup>, mejor respuesta inmune con caseína que con proteína de legumbres<sup>4</sup>, menor presión arterial en individuos alimentados con proteína vegetal respecto animal<sup>5</sup>.

finally a lower blood pressure was registered in individuals fed on vegetal proteins than those fed on animal proteins<sup>5</sup>.

**TABLA I.** Principales péptidos bioactivos obtenidos por hidrólisis de las proteínas de leche humana y de vaca.

	<b>Péptidos bioactivos</b>	<b>Origen de la leche</b>		<b>Bioactividad descrita</b>
Caseína $\alpha$	$\alpha$ casomorfina		Vaca	Actividad opi <del>A</del> Eea
	caseína $\alpha$ exorfina		Vaca	Actividad opi <del>A</del> Eea
	casokinina		Vaca	Actividad antihipertensiva
Caseína $\beta$	$\beta$ casomorfina	Human	Vaca	Act. opi <del>A</del> Eea
	casokinina	a	Vaca	Act. Inmunomoduladora+ Antihiperter
	Caseinfosfo <del>p</del> ptido	Human	Vaca	Biodsiponibilidad mineral
Caseína $\kappa$	Caseinmacrop <del>p</del> ptido	a	Vaca	Modulaci n de la motricidad gastroin
	Casoxina	Human	Humana	liberaci n de hormonas
	Casoplatelinas	a		Antagonista opi <del>A</del> Eeo
$\alpha$ -lactoalb <del>o</del> mina	Fragmentos 50-53	Human	Vaca	Actividad antitromb tica
		a		Actividad opi <del>A</del> Eea
$\beta$ -lactoglobulina	$\beta$ -lactorfinas		Vaca	Actividad opi <del>A</del> Eea+antihipertensiva
Lactoferrina			Vaca	
lactotransferrina	Lactoferrosina	Human	a	Antagonista opi <del>A</del> Eeo

**TABLA I.** Main bioactive peptides obtained from milk and cow proteins hydrolysis.

	Bioactive peptides	Milk origin		Described bioactivity
$\alpha$ -casein	$\alpha$ -casomorphin		Cow	Opioid activity
	casein $\alpha$ -exorphin		Cow	Opioid activity
	casokinin		Cow	Antihypertensive activity
$\beta$ -casein	$\beta$ -casomorphin	Human	Cow	Opioid activity
	casokinin	Human	Cow	Opioid activity
	caseinfosfopoptide	Human	Cow	Antihypertensive Mineral bioavailability
$\kappa$ -casein	caseinmacropeptide		Cow	Gastrointestinal motor function modulation and hormone releasing
	casoxin	Human	Human	Gastrointestinal motor function modulation and hormone releasing
	casoplatelins			Opioid antagonist Antithrombotic activity
$\alpha$ -lactalbumin	fragments 50-53	Human	Cow	Opioid activity
$\beta$ -lactoglobulin	$\beta$ -lactofrins		Cow	Hypertensive+opioid activity
lactoferrin			Cow	
	<i>lactoferroxin</i>			Opioid antagonist
lactotransferrin		Human		

#### *Absorción de péptidos a través del epitelio intestinal*

La mayor parte de la proteína es absorbida en forma de péptidos y no como aminoácidos libres. Además de la acción de las enzimas proteolíticas, los péptidos sufren una digestión adicional mediante las peptidasas del borde en cepillo y citoplasmáticas. La mayoría de los péptidos de más de tres aminoácidos son hidrolizados extracelularmente por las enzimas del borde en cepillo. Mientras que los dipéptidos y tripéptidos pueden ser absorbidos intactos. Dipeptidasas y tripeptidasas pueden posteriormente hidrolizar estos péptidos a aminoácidos, pero parece probado que algunos de estos pueden escapar al ataque enzimático y alcanzar intactos la circulación sanguínea<sup>1</sup>.

Estudios en humanos demuestran el paso a través del epitelio intestinal de péptidos de diferentes tamaños que tienen la característica de tener bloqueado los terminales amino. Ejemplo de esto es la hormona luteinizante (LHR). La LHR es un decapeptido con los terminales bloqueados (pi-

#### *Peptides Absorption through the Intestinal Epithelium*

The greater part of the protein is absorbed as peptides and not as free aminoacids. Besides the action of proteolytic enzymes, peptides suffer an additional digestion by cytoplasmatic and brush-border peptidasas. Almost all peptides consisting of more than three aminoacids are hydrolysed outside the cell by brush-border enzymes. Dipeptides and tripeptides instead, can be absorbed intact. Dipeptidasas and tripeptidasas can later hydrolyse these peptides into aminoacids, but it seems to be that some of them can resist enzymatic attack, remaining intact to reach the blood circulation<sup>1</sup>.

Studies carried out in humans show the flow of peptides of different sizes through the intestinal epithelium, which are characterised by their blocked amino terminals. Luteinizing hormone (LH) is an example. This hormone is a decapeptide with blocked terminals (pyroglutamate in its N-terminal and glycine in its C-terminal), making it resistant to peptidasas attack. After, ora-

roglutamato en el extremo N-terminal y glicina en el C-terminal) lo que le confiere resistencia al ataque de las peptidasas. La LHR bloqueada también estimula la liberación de la hormona luteinizante tras administración oral (diez microgramos de LHR oral incrementan los niveles plasmáticos de hormona en un 451%)<sup>6</sup>.

Otro ejemplo lo constituye la hormona liberadora de tirotrópina (THR), un tripeptido con un piroglutamato en el extremo N-terminal. La THR es secretado como tripéptido y metabolizado a dipéptido activo. Se absorbe a través del tracto gastrointestinal y estimula la liberación de la hormona estimulante del tiroides<sup>7</sup>. También se le atribuyen actividad hipertensiva y neuromoduladora<sup>8,9</sup>.

## BENEFICIOS DE LOS PÉPTIDOS BIACTIVOS

### *Péptidos con efectos sobre el sistema digestivo*

Se han aislado péptidos que muestran una actividad opiácea. Éstos, se unen a los receptores en el lumen intestinal y actúan como moduladores exógenos de la motilidad gastrointestinal, permeabilidad intestinal y liberación de hormonas intestinales. Entre ellos se encuentran los péptidos llamados casomorfina, péptidos de 4-10 aminoácidos derivados de la  $\alpha$  y  $\beta$  caseína. Concretamente las  $\beta$ -casomorfina son capaces de reducir la secreción gástrica y la motilidad intestinal, por lo que actualmente existe gran interés por su posible papel beneficioso en el tratamiento de la diarrea. Más aún<sup>10</sup>, postula que estas casomorfina podrían ejercer un efecto local, sin necesidad de absorción sistémica, reduciendo el reflejo peristáltico mediante reducción de la respuesta refleja. Esto lleva a pensar en un posible rol terapéutico en el tratamiento de desórdenes gástricos. También se han descrito los péptidos de actividad opioide antagonista, como las casoxinas (procedente de  $\kappa$ -caseína) y lactoferroxinas, que parece podrían antagonizar el efecto de inhibición de la motilidad gástrica inducida por las casomorfina. Ahora bien, en la leche parece dominar la actividad opioide dada que las  $\alpha$  y  $\beta$  caseínas se encuentran en mayor concentración en la leche madura que la  $\kappa$ -caseína<sup>11</sup>.

Otros péptidos de acción sobre el sistema gastrointestinal son los llamados caseinmacro-

ly administered blocked LH also stimulates the releasing of the luteinizing hormone. Ten micrograms of oral LH increases the hormone plasma level by 45%<sup>6</sup>

Another example is protilerin a tripeptide with a pyroglutamate in its N-terminal, it is secreted as a tripeptide and is metabolised to an active dipeptide. It is absorbed through the gastrointestinal tract and it stimulates the release of thyroid stimulating hormones<sup>7</sup>. It also has a hypertensive and neuromodulatory activity<sup>8,9</sup>.

## THE BENEFITS OF BIOACTIVE PEPTIDES

### *Peptides affecting the digestive system*

Peptides showing opiate activity, have been isolated. They join the receptors in the intestinal lumen and act as exogenic modulators of gastrointestinal motility, intestinal permeability, and intestinal hormone release. Among these peptides, casomorphins (peptides ranging from 4 to 10 aminoacids, derived from  $\alpha$  and  $\beta$ -casein) can be found. In particular,  $\beta$ -casomorphins may reduce gastric secretion and intestinal and therefore there is a great interest for its possible beneficial treatment for diarrhoea. Moreover, these casomorphins could have a local effect, without the necessity of systemic absorption, reducing the peristaltic reflex through the reduction of the reflex response<sup>10</sup>. This leads to thinking concerning a possible therapeutic role in the treatment for gastric disorders. Antagonist opioid active peptides such as casoxins (from  $\kappa$ -casein) and lactoferroxins have also been described. These peptides could antagonise the inhibiting effect of the gastric motility of casomorphins. In milk, opioid activity seems to prevail, since in mature milk  $\alpha$  and  $\beta$ -caseins are in greater proportion than  $\kappa$ -casein<sup>11</sup>.

Caseinmacropeptides are other peptides, which act on the gastrointestinal system. They are connected with the secretion of the cholecystokinin hormone, which regulates pancreatic secretion and gastric emptying<sup>12</sup>. The so-called glycomacropeptide (GMP), has been object of several studies. It is obtained after the initial digestion of the  $\kappa$ -casein; the result is  $\kappa$ -paracasein and GMP. It covers the aminoacids 106 and 109 of the  $\kappa$ -casein. It has several functions, such as

péptidos, relacionados con la secreción de la hormona colecistoquinina reguladora de la secreción pancreática y reguladora del vaciamiento gástrico<sup>12</sup>. El denominado glicomacropéptido (GMP) ha sido objeto de numerosos estudios. Resultado de la inicial digestión de la  $\kappa$ -caseína con obtención de la  $\kappa$ -paracaseína y el GMP (comprende los aminoácidos 106-169 de la  $\kappa$ -caseína). Se le atribuyen numerosas funciones biológicas como ser factor estimulador de bifidobacterias (al contener oligosacáridos), fuente de ácido siálico (importante para el desarrollo cerebral) del lactante, actividad antiviral (debido a los residuos de ácido siálico), modulador de las secreciones gástricas y puede ser objeto de nuevas digestiones dando lugar a péptidos bioactivos con actividad antitrombótica<sup>13</sup>.

#### *Péptidos con efectos inmunomoduladores y antimicrobianos*

Se han descubierto determinados péptidos que ejercen un efecto protector sobre el organismo ya sea potenciando el sistema inmune o mostrando un efecto antimicrobiano. Suelen ser pequeños péptidos de 4-6 aminoácidos, como por ejemplo el Met-enkefalin, que altera la respuesta inmune y retrasa la respuesta de hipersensibilidad cutánea<sup>14</sup>. Como ejemplo de actividad antimicrobiana, podemos citar fragmentos de la caseína  $\alpha$  conocidos como isracidina, que muestran *in vivo* un efecto antimicrobiano frente a *Staphylococcus aureus*<sup>15</sup>.

#### *Péptidos con efectos sobre el sistema cardiovascular*

Los principales efectos descritos sobre el sistema cardiovascular son de actividad antihipertensiva y actividad antitrombótica. Los péptidos que poseen actividad antihipertensiva lo hacen por inhibición de la enzima de la conversión de angiotensina. Esta enzima es clave en la regulación de la presión sanguínea al convertir la angiotensina I en angiotensina II que es un potente vasoconstrictor. Se han descrito tres péptidos de la  $\alpha$ -S1 caseína y dos de la  $\beta$ -caseína que muestran esta actividad<sup>16</sup>.

El efecto antitrombótico de otra serie de péptidos procedentes, entre otros lugares, de la ca-

bifidobacterium stimulating factor (since it has oligosaccharides), sialic acid source (important for the infant cerebral development), antiviral activity (due to sialic acid rests), and gastric secretion modulator. Finally, since it can be again digested, it can produce bioactive peptides with antithrombotic activity<sup>13</sup>.

#### *Peptides with immunomodulatory and antimicrobial effects*

Certain peptides, which have a protective effect on the organism, either enhancing the immune system or showing an antimicrobial effect, have been discovered. They usually are small peptides (consisting of 4 or 6 aminoacids), such as met-enkephalin, which modifies the immune response and delays cutaneous hypersensitivity response<sup>14</sup>. As an example of antimicrobial activity, we can mention fragments of  $\alpha$ -casein, known as isracidin, which show *in vivo* an antimicrobial effect against *Staphylococcus aureus*<sup>15</sup>.

#### *Peptides effecting the cardiovascular system*

The main effects described on the cardiovascular system are antihypertensive and antithrombotic activity. Certain peptides have a hypertensive activity due to the inhibition of the enzyme responsible for angiotensin conversion, and upon the conversion of angiotensin I to angiotensin II, this enzyme is essential for the regulation of the blood pressure, as angiotensin II is a strong vasoconstrictor. Another three peptides from  $\alpha$ -S1-casein and two more from  $\beta$ -casein also show this activity<sup>16</sup>.

The antithrombotic effect of other peptides, such as those of cow milk  $\kappa$ -casein, seems to be caused by their structural similarity to fibrinogen ? chain, so that they are in competition with platelet receptors, inhibiting therefore platelet aggregation<sup>17</sup>.

## MILK WHEY PROTEINS

Whey is a high and varied mixture of secreted proteins, which contain a wide range of chemical, physical, and functional properties. Particularly, whey proteins constitute 20% of the cow

seína-  $\kappa$  de la leche de vaca, parece venir dada de la similitud estructural de éstos con la cadena  $\gamma$  del fibrinógeno, de forma que entran en competencia con los receptores plaquetarios, inhibiendo así, la agregación plaquetaria<sup>17</sup>.

## PROTEÍNAS DEL SUERO LACTEO

El suero representa una rica y variada mezcla de proteínas secretadas y que poseen amplio rango de propiedades químicas, físicas y funcionales. Concretamente, las proteínas del suero suponen alrededor del 20% de las proteínas de la leche de vaca. Estas proteínas no sólo juegan un importante papel nutritivo como una rica y balanceada fuente de aminoácidos, sino que además, en muchos casos, parecen ejercer determinados efectos biológicos y fisiológicos, *in vivo*. Entre estas proteínas se incluyen  $\alpha$ -lactoalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina, lactoferrina, lactoperoxidasa, inmunoglobulinas, glicomacropéptidos y una gran variedad de factores de crecimiento. Como hemos comentado, estas proteínas están implicadas en un gran número de efectos biológicos observados en estudios en animales y humanos, y que se resumen en parte en la tabla 2. Pero más aún, estas mismas proteínas, una vez parcialmente hidrolizadas, sirven de fuente de numerosos péptidos que poseen actividades biológicas y fisiológicas.

milk proteins. These proteins not only play an important nutritive role as a rich and balanced aminoacids source, but in many cases they also seem to have certain *in vivo* biological and physiological effects. Within these proteins are  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, lactoferrin, lactoperoxidase, immunoglobulins, glycomacropéptides, and a large variety of growth factors. As we have previously stated, these proteins are involved in many biological effects observed in animal and human studies, which are summarised in Table 2. But these proteins, after being partially hydrolysed, function as source of many peptides with biological and physiological activities.

Lately many research studies have been carried out, either in the public or the private sector. They are based on two aims: first of all, to evaluate the possible physiological effects of these proteins on clinical essays, and secondly the development or not of nutritive products with whey proteins and fragments of them, acting as health enhancing components.

**TABLA II.** Efecto funcional de las proteínas y péptidos del suero lácteo<sup>19</sup>.

Proteína o péptido	Efecto funcional
Proteína de suero total	Anticarcinogénico Inmunoestimulador Longevidad
$\beta$ -Lactoglobulina	Hipocolesterolémico Función digestiva
$\beta$ -Lactoferrina	Agonista opioide
$\alpha$ -Lactoalbúmina	Anticarcinogénico
$\alpha$ -Lactoferrina	Agonista opioide
Lactoferrina	Antimicrobiano Transporte y regulación del hierro Inmunoestimulador Antiinflamatorio
Lactoferricina	Crecimiento y proliferación celular Anticarcinogénico
Inmunoglobulinas	Antimicrobiano
Lactoperoxidasa	Inmunidad pasiva
Factores de crecimiento	Antibacteriano Diferenciación y crecimiento celular Reparación y protección de la mucosa intestinal Reparación de lesiones
Albumina sérica	
Serorfina	Agonista opioide

TABLE II. Functional effect of milk whey proteins and peptides<sup>19</sup>.

Protein or peptide	Functional effect
Total whey protein	Anticarcinogenic Immunoenhancing Longevity
$\beta$ -Lactoglobulin	Hypocholesterolemic
$\beta$ -lactorphan	Digestive function
$\alpha$ -Lactalbumin	Opioid agonist
$\alpha$ -lactorphan	Anticarcinogenic
Lactoferrin	Opioid agonist Antimicrobial
	Iron transport and regulation
	Immunoenhancing
	Antiinflammatory
	Cell growth and proliferation
	Anticarcinogenic
$\gamma$ -lactoferricin	Antimicrobial
Immunoglobulins	Passive immunity
Lactoperoxidase	Antibacterial
Growth factors	Cell differentiation and growth Intestinal mucus repair and protection
	Lesson repara
Whey albumin	
	Opioid agonist
Serorphan	

En los últimos años, se están llevando a cabo numerosas investigaciones, tanto por el sector público como privado, con dos objetivos claros: en primer lugar, evaluar de forma científica los posibles efectos fisiológicos de estas proteínas en ensayos clínicos, y en segundo lugar, desarrollo de productos alimenticios o no, donde las proteínas del suero y fracciones de la misma formen parte de la composición, actuando como ingredientes promotores de la salud.

### EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS PROTEÍNAS DEL SUERO LÁCTEO

Las principales actividades descritas en bibliografía de las proteínas del suero son, por un lado, su actividad anticancerosa y, más concretamente, su papel protector frente al cáncer de colon, y por otro, su papel como estimulador de la respuesta inmune.

#### *Proteínas del suero y actividad anticancerosa*

Numerosos estudios en animales muestran el efecto anticarcinogénico de las proteínas del suero

### BIOLOGICAL EFFECTS OF MILK WHEY PROTEINS

The main activities described in the bibliography about whey proteins are, on the one hand, its anticarcinogenic activity and more specifically, its protective role against colon cancer, and on the other, its role as an immune response stimulator.

#### *Whey proteins and Anticarcinogenic Activity*

Many studies on animals show the anticarcinogenic effect of total whey proteins. In an experiment a group of mice was fed on three different diets; the first diet consisted of normal feed, the second one of whey protein added feed (20g/100g), and the third one of casein added feed (20g/100g). After 28 weeks, a lower incidence of tumours in the mice fed on of whey proteins could be observed, followed by those fed on casein diet, and finally by those fed on normal feed. At the end of the experiment, all mice fed on whey were alive, while 33% of mice fed on the other two diets had died<sup>18</sup>. More recently, it has been stated that milk proteins have a protective capa-

totales<sup>18</sup>, en ratones alimentados con pienso normal o adicionado de 20g/100g de proteínas del suero o caseína, encuentran a las 28 semanas, una menor incidencia y área de tumores en los ratones alimentados con proteínas del suero, seguido de los alimentados con caseína, y por último, los alimentados con pienso normal. Al final del experimento, todos los ratones alimentados con suero estaban vivos, mientras que el 33% de los alimentados con las otras dos dietas habían muerto. Más recientemente<sup>19</sup>, establecían que las proteínas lácteas tenían capacidad protectora contra el desarrollo de tumores de colon en modelo de ratas con tumores inducidos por dimetilhidrazina. Más aún, las proteínas del suero fueron particularmente efectivas en la reducción de la incidencia y tamaño de los tumores respecto de proteínas cárnicas y de soja.

Estudios en cultivos celulares muestran que las proteínas del suero y fracciones de la mismas, inhiben selectivamente el desarrollo de las células cancerosas. En cultivos de la línea MCF-7 de células de cáncer de mama y línea celular de cáncer de próstata, la adición de proteínas del suero disminuye el desarrollo de las células<sup>20</sup>.

La hipótesis más aceptada que explica el efecto protector de las proteínas del suero frente al cáncer de colon está relacionada al aumento de las concentraciones tisulares de glutatión mediada por dichas proteínas<sup>21</sup>. La glutatión es un sustrato de dos clases de enzimas que catalizan detoxificación; la glutatión peroxidasa selenio dependiente y la familia de las glutatión transferasas. En base a esto, la actividad anticarcinógena está relacionada con las dos enzimas. Por un lado, reducción mediante la glutatión peroxidasa de peróxido de hidrógeno, radicales libres y especies reactivas al oxígeno, que pueden dañar al DNA. Por otro lado, la familia de las glutatión transferasas cataliza la conjugación de compuestos tóxicos, incluidos mutágenos y carcinógenos para ser eliminados del organismo<sup>22</sup>.

Bounous y colaboradores<sup>23</sup>, obtuvieron en ratones alimentados con dietas con proteínas del suero como fuente proteica, mayores concentraciones de glutatión en tejido hepático y corazón que aquellos alimentados con caseína como fuente proteica o pienso estándar. Consideran que este incremento era debido no sólo al alto contenido de selenio en las proteínas del suero, sino también, a la presencia de grupos  $\gamma$ -glutamilcisteínicos, sustrato para la síntesis de glutatión, pre-

city against the development of colon tumours in rats, where tumours were provoked by dimethylhydrazine. Moreover, whey proteins were particularly effective in reducing the incidence of tumours and their size compared to meat and soya proteins<sup>19</sup>.

Cell culture studies show that whey proteins and their fractions selectively inhibit the development of cancerous cells. In MCF-7 line cultures of breast cancer cells and prostate cancer cell line, the addition of whey proteins decreases the development of cancerous cells<sup>20</sup>.

The most accepted hypothesis explaining the protective effect of whey proteins against colon cancer is connected with the increase of glutathione tissue concentrations, which are mediated by those proteins<sup>21</sup>. Glutathione is a substrate consisting of two sorts of enzymes, that catalyse detoxification, selenium-dependent glutathione peroxidase and glutathione transferase family. According to this, anticarcinogenic activity is connected with these two enzymes. On the one hand, and through glutathione peroxidase, it reduces hydrogen peroxide, free radicals, and oxygen-reactive species, which may damage DNA. On the other, the glutathione transferase family catalyses the conjugation of toxic compounds, mutagens and carcinogens included, to remove them from the organism<sup>22</sup>.

Higher concentrations of glutathione in the hepatic tissue and in the heart were obtained from mice fed on a whey proteins diet as a proteic source than in those fed on a casein diet or normal feed. It was considered that this increase was due not only to the high content of selenium in whey proteins, but also to the presence of  $\gamma$ -glutamylcysteine groups, a substrate used for glutathione synthesis, which are present in the whey albumin fraction<sup>23</sup>.

#### *Whey Proteins and Immune Response*

Whey proteins seem to enhance immune response, either humoral or cellular<sup>24,25</sup>. The possible immunomodulatory action seems to be related to this, due to the increase of glutathione concentration, which is mediated by whey proteins. The presence of non-denaturalised glutamylcysteine resting in the albumin fraction is presumably the cause of this. Glutathione is necessary for both lymphocyte proliferation and

sentés mayoritariamente en la fracción de albúmina sérica.

### *Proteínas del suero y respuesta inmune*

Las proteínas del suero parecen potenciar la respuesta inmune, tanto humoral como celular<sup>24,25</sup>. La posible acción inmunomoduladora parece estar relacionada también por el aumento de la concentración de glutatión mediada por las proteínas del suero. La presencia en la fracción de albúmina de restos no desnaturalizados de glutamilmilcisteína parece ser la causa de la misma. La glutatión es necesario para la actividad y proliferación linfocitaria, particularmente células T, e inmunocompetencia<sup>26</sup>.

Bounous, en un estudio posterior encuentran que en ratas alimentadas con una dieta con proteínas del suero como fuente proteica, la respuesta inmune era cinco veces mayor que en aquellas con dietas con caseína o caseína con cisteína suplementada. Pero además, este estudio demuestra que ese incremento de respuesta inmune está acompañada de un aumento de la producción de glutatión en el bazo durante la expansión linfocitaria<sup>27</sup>.

También encuentran que las proteínas del suero de la dieta incrementan la respuesta inmune humoral<sup>25</sup>. La respuesta inmune secundaria a la inmunización con ovoalbúmina fue significativamente mayor en ratas alimentadas con proteínas del suero como fuente proteica respecto de proteína de soja. Además, La concanavalina A, mitógeno de células T, inducía una mayor proliferación celular en el bazo.

Se han llevado a cabo muy pocos estudios en humanos aunque con resultados esperanzadores<sup>28</sup>, basándose en que, al contrario que en células normales, las proteínas del suero podrían disminuir las concentraciones de glutatión en células cancerosas, sugiere que podría ser útil administrar este tipo de proteínas disminuir las concentraciones de glutatión y así hacer más vulnerables las células cancerosas a la acción de la quimioterapia. Por otro lado<sup>29</sup>, tras administrar durante tres meses a tres individuos HIV-seropositivos un suplemento de proteínas del suero, encuentran un incremento de los valores subóptimos de glutatión de las células mononucleares sanguíneas.

activity, specifically T cells and immunocompetence<sup>26</sup>.

Bounous, in a later study based on rats fed on a whey proteins diet as a proteic source, found that the immune response was five times higher than in those fed on casein diets or cystein-supplemented casein diets. Moreover, the study shows that this immune response increase is followed by an increase in the production of glutathione in the spleen during lymphocyte expansion<sup>27</sup>.

Also found that diet whey proteins increase humoral immune response<sup>25</sup>. The secondary immune response to egg albumin immunisation was significantly higher in rats fed on whey proteins as a proteic source compared to soya proteins. Furthermore, A-concanavalin, a T cell mitogen, provoked a higher cell proliferation in the spleen.

Few studies on humans have been carried out, although the results have been satisfactory. According to the statement that, unlike in normal cells, whey proteins could reduce glutathione concentrations in cancerous cells<sup>28</sup>, there is a suggestion that providing these proteins might reduce glutathione concentrations. Therefore, chemotherapy would be more effective against cancerous cells. It was also observed that after administering a whey proteins supplement to three HIV seropositive individuals during three months, an increase of glutathione suboptimal values in blood mononuclear cells was found<sup>29</sup>.

## BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

- 1.- Robert P.R., Zaloga G.P. (1994) Dietary bioactive peptides. *New Horizons*, **2**:237-243.
- 2.- Yamamoto N. (1997) Antihypertensive peptides derived from food protein. *Biopolymers*, **43**:129-43.
- 3.- Bounous G., Kongshavn P.A.L. (1982) Influence on dietary proteins on the immune system of mice. *J Nutr.*, **112**:1747-1755.
- 4.- Martínez J.A., Macarulla M.T., Marcos R. (1992) Nutritional outcome and immunocompetence in mice fed on a diet raw field beans as the source of protein. *Br J Nutr.*, **68**:493-503.
- 5.- Rouse I.L., Beilin L.J. (1994) Vegetarian diets and blood pressure. *J Hypertension*, **2**:231-240.
- 6.- Amoss M., Rivier J., Guillemin R. (1972) Release of gonadotropins by oral administration of synthetic LRF or a tripeptide fragment of LRF. *J Clin Endocrinol Metab.*, **35**:175-177.
- 7.- Gardner M.G. (1984) Intestinal assimilation of intact peptides and proteins from the diet- A neglected field. *Biol Rev.*, **59**:289-331.
- 8.- Zaloga G.P., Chernow B., Zajchuk R. (1984) Diagnostic dosages of protirelin (THR) elevated blood pressure by noncatecholamine mechanisms. *Arch Inter Med.*, **114**:1149-52.
- 9.- Holaday J.W., Bernton E.W. (1984) Protirelin (THR)-A potent neuromodulator with therapeutic potential. *Arch Inter Med.*, **114**:1138-1140.
- 10.- Allescher H.D., Storr M., Piller C., Brantl V., Schusdzarra V. (2000) Effect of opioid active therapeutics on the ascending reflex pathway in the rat ileum. *Neuropeptides.*, **34**:181-186.
- 11.- Schanbacher F.L., Talhouk R.S., Murray F.A., Gherman L.I., Willett L.B. (1998) Milk-borne Bioactive peptides. *Int Dairy J.*, **8**:393-403.
- 12.- Beucher S., Levenez F., Yvon M., Corring T (1994) Effects of gastric digestive products from casein and CCK release by intestinal cells in rats. *J Nutr Biochem.*, **5**:578-584
- 13.- Steijns J. (1996) Dietary proteins as the source of new health promoting bio-active peptides with special attention to glutamine peptide. *Food Tech Europe*, March/April:80-84.
- 14.- Jankovic B.D., Maric D. (1990) In vivo modulation of the immune system by enkephalins. *Int J Neurosci.*, **51**:167-169.
- 15.- Lahov E., Regelson W. (1996) Antibacterial and stimulating casein-derives substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food Chem Toxic.*, **34**:131-145.
- 16.- Schlimme E., Meisel H. (1995) Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. *Die Nahrung*, **39**:1-20.
- 17.- Jolles P., Levy-Toledano S., Fiat A.M., Soria P., Gillesen D., Thomaidis A., Dunn F.W., Caen J.P. (1986) Analogy between fibrinogen and casein. Effect on an undecapeptide isolated from  $\kappa$ -casein on platelet function, **158**:379-382.
- 18.- Papenburg R., Bounous G., Fleischer D., Gold P. (1990) Dietary milk proteins inhibit the development of dimethylhydrazine-induced malignacy. *Tumor Biol.*, **11**:129-136.
- 19.- McIntosh G.H., Regester G.O., Le Leu R.K., Royle P.J., Smithers G.W. (1995) Dairy proteins protect against dimethylhydrazine-induced intestinal cancers in rats. *J Nutr.*, **125**:809-816.
- 20.- Bourtourault M., Buleon R., Samperez S., Jouan P. (1991) Effet des pteines du lactoserum bovin sur la multiplication de cellules cancreuses humaines. *C R Soc Biol.*, **185**: 319-323.
- 21.- Bounous G., Batist G., Gold P (1991) Whey protein in cancer prevention. *Cancer Lett.*, **57**:91-94.
- 22.- Coles B., Ketterer B. (1990) The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Crit Rev Bichem Mol Biol.*, **25**:47-70.
- 23.- Bounous G., Gervais F., Amer V., Batist G., Gold P (1989a) The influence of dietary whey protein on tissue glutathione and the diseases of aging. *Clin Invest Med.*, **12**:343-349.
- 24.- Bounous G., Kongshavn P.A.L., Gold P (1988) The immuno enhancing property of dietary whey protein concentrate. *Clin Invest Med.*, **11**:271-8.
- 25.- Wong C.W., watson D.L. (1995) Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice. *J Dairy Res.*, **62**:359-368.
- 26.- Suthanthiran J., Anderson M.E., Sharma V.K., Meister A. (1997) Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal T lymphocytes stimulated via the CD2 and CD3 antigens. *Proc Nat Acad Sci USA*, **87**:3343-3347.
- 27.- Bounous G., Batist G., Gold P (1989b) Immunoenhancing properties of dietary whey protein in mice: role of glutathione. *Clin Invest Med.*, **12**:154-161.
- 28.- Kennedy R.S., Konok G.P., Bunous G., Baruchel S., Lee T.D. (1995) The use of a whey protein concentrate in the treatment of patients with metastatic carcinoma: a phase I-II clinical study. *Anticancer Res.*, **15**:2643-2649.
- 29.- Bounous G., Baruchel S., Falutz J., Gold P (1993) Whey proteins as a food supplement in HIV-seropositive individuals. *Clin Invest Med.*, **16**:204-209.