



La concentración en proteínas de la leche bovina es de 33 gramos por litro, las caseínas constituyen el 78,2% y las proteínas del suero representan el 16,8%. El porcentaje restante incluye hormonas y enzimas.

La leche bovina contiene cuatro tipos principales de caseínas:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ . La fracción caseínica total puede obtenerse por precipitación isoelectrónica a pH 4,6 (1).

Un cuajo adecuado para la fabricación de quesos se caracteriza por su alta especificidad frente al enlace Phe105-Met106 de la  $\kappa$ -caseína y su baja actividad proteolítica general, es decir la enzima debe clivar en forma rápida dicho enlace pero debe tener baja afinidad relativa respecto de otros enlaces de  $\kappa$ -,  $\beta$ - y  $\alpha_s$ -caseínas para evitar la producción de pequeños péptidos amargos y otros problemas organolépticos y reológicos (2). La quimosina es el principal componente enzimático (88-94%) del cuajo de ternero, tradicionalmente obtenido del cuarto estómago o abomasa de terneros neonatos (3). Es una excelente enzima coagulante de la leche que se utiliza en queso debido a que cumple con las características de especificidad antes mencionadas. Sin embargo, en los últimos años, se ha intensificado la búsqueda de nuevos coagulantes de la leche debido a la escasez y al alto costo del cuajo obtenido de terneros lactantes, a las objeciones a los productos recombinantes, al incremento mundial del consumo de quesos y, en algunos países, a principios religiosos y culturales.

Varias peptidasas vegetales son capaces de coagular la leche, aunque la mayoría son inapropiadas para la producción de quesos debido a su elevada actividad proteolítica, que produce la degradación del coágulo. En la Península Ibérica se utilizan proteasas aspárticas de origen vegetal en la producción de quesos a partir de leches de cabra y oveja con denominación de origen (2, 4, 5).

## Acción de las peptidasas de *Silybum marianum* (L.) Gaertn sobre caseínas bovinas

### Action of *Silybum marianum* (L.)

### Gaertn Peptidases on bovine caseins

M. E. Rusconi,  
N. S. Priolo,  
L. M. I. López\*  
S. E. Vairo Cavalli

LIPROVE, Dpto. de Cs. Biológicas, Fac. Cs. Exactas, UNLP, CC 711, 1900, La Plata, Argentina. E-mail:

lmiopez@biol.unlp.edu.ar

\*Autor para la correspondencia/Corresponding author  
e-mail: lmiopez@biol.unlp.edu.ar

#### Resumen

Las caseínas (CN) constituyen el 80% de las proteínas totales de la leche, siendo  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  y  $\kappa$  las cuatro fracciones mayoritarias. La función principal de las CN es nutritiva y los péptidos derivados de las mismas tienen interesantes aplicaciones como suplementos dietarios y en preparaciones farmacéuticas. Las CN totales fueron obtenidas a partir de leche bovina comercial por precipitación isoelectrónica y purificadas mediante cromatografía de intercambio aniónico (FPLC) utilizando DEAE Sepharose FF a pH 7,0. Las fracciones  $\alpha$  y  $\beta$  CN purificadas fueron hidrolizadas empleando aspartilendopeptidasas de flores de *Silybum marianum* y con cuajo bovino comercial. Tanto las CN como los péptidos obtenidos fueron analizados por electroforesis SDS Tricina PAGE y densitograma. Los perfiles hidrolíticos mostraron una actividad diferencial y específica con la preparación enzimática de *S. marianum*, sin proteólisis excesiva. En base a estos resultados, esta preparación enzimática podría ser empleada para la obtención de nutracéuticos o como sustituto de rennet comercial.

**Palabras claves:** hidrolizados, caseínas, peptidasas vegetales, nutracéuticos, rennet.

#### Summary

Bovine milk contains four main types of casein (CN),  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ , and  $\kappa$ , constituting 80% of total protein milk. The main function of CN is nutritious and peptides derived from them have interesting applications as dietary supplements and pharmaceutical preparations. In the present work whole CN were obtained from commercial bovine milk by isoelectric precipitation and were subsequently purified by anion exchange chromatography (FPLC) with DEAE Sepharose FF media, pH 7.0.  $\alpha$  and  $\beta$  CN fractions purified were hydrolysed with aspartilendopeptidases from flowers of *Silybum marianum* and with commercial rennet. Both the CN as the peptides obtained were analyzed by electrophoresis (Tricine SDS PAGE) and densitograms. Hydrolytic profiles showed a differential and specific activity for the *S. marianum* enzymatic preparation without excessive proteolysis. Based on these results the enzymatic preparation could be advantageously for obtaining nutraceuticals or as a substitute for commercial rennet.

**Key words:** hydrolysates, casein, plant peptidases, nutraceuticals, rennet.



Marzo | 421  
Alimentaria | 2011

Los hidrolizados proteicos pueden obtenerse a partir de una degradación parcial o total de las proteínas. La hidrólisis enzimática tiene la ventaja de que puede llevarse a cabo bajo condiciones de reacción suaves (pudiendo mantener la calidad nutricional de los aminoácidos), produce hidrolizados compuestos por mezclas peptídicas bien definidas, evita la destrucción de los L-aminoácidos y la formación de sustancias tóxicas como la lisin-alanina. La hidrólisis parcial de las proteínas permite modificar sus propiedades químicas, físicas, biológicas e inmunológicas. Dicha hidrólisis es llevada a cabo actualmente por numerosas razones: mejoramiento de las características nutricionales, retardo en el deterioro, modificación de diferentes propiedades funcionales (solubilidad, capacidad de formación de espuma, capacidad coagulante y emulsificante), obtención de péptidos y aminoácidos, prevención de interacciones indeseadas, cambios de sabor y remoción de factores inhibitorios o tóxicos (6). En nuestro laboratorio se han obtenido hidrolizados proteicos empleando diferentes fitopeptidasas (7-10).

Una de las características de los hidrolizados es su alta absorción a nivel gastrointestinal en relación a la proteína completa, por lo que pueden utilizarse en dietas para pacientes con malfuncionamiento gastrointestinal por reducción del área de absorción o por una capacidad digestiva reducida (fibrosis quística y pancreatitis), personas mayores, en nutrición deportiva y para el control de peso (11, 12).

Los hidrolizados parciales de caseínas se utilizan desde hace más de 50 años en niños con alergia a la leche bovina y su efecto positivo sobre el sistema inmune está bien documentado (13).

Por otra parte, péptidos con actividad biológica pueden estar ocultos o inactivos en la secuencia aminoacídica

de las proteínas lácteas y ser liberados o activados in vivo durante la digestión gastrointestinal, o más aún, durante el procesamiento de los alimentos vía proteólisis enzimática específica. Generalmente, son péptidos de pequeño tamaño, de 3 a 20 aminoácidos. Las caseínas, tanto en la leche sin procesar como en los productos lácteos, son una fuente importante de los péptidos arriba mencionados y su importancia biológica, el impacto en la salud humana y en la manufactura de nuevos aditivos funcionales para los alimentos ha sido motivo de intensa investigación (14, 15).

Argentina cuenta en este momento con la ventaja de poseer el ganado vacuno libre de encefalopatía espongiforme bovina (EEB) según el Comité Internacional de la Organización Mundial de Sanidad Animal y esto puede aprovecharse para la producción de caseínas y sus hidrolizados sin riesgo biológico. En este trabajo se presentan los resultados obtenidos al emplear las fitoproteasas aspárticas de *Silybum marianum* para hidrolizar caseínas y como coagulante de leche bovina.

#### **Materiales y métodos**

##### **Obtención de extractos enzimáticos**

Se utilizaron flores de *Silybum marianum* (L.) Gaertn, (Asteraceae) popularmente conocido como cardo mariano o cardo asnal. Las mismas fueron congeladas con N<sub>2</sub> líquido y trituradas hasta obtener un polvo fino al cual se le agregó inmediatamente buffer de extracción (cítrico-citrato 100 mM de pH 3,0; conteniendo EDTA 1,0 mM).

La suspensión obtenida se agitó en un baño de hielo durante 30 minutos y se clarificó por centrifugación durante 20 minutos a 5000 × g y 4 °C. El extracto así obtenido se fraccionó en alícuotas y se conservó a -20°C (9).

##### **Determinación de la actividad coagulante de leche**

Se preparó una solución de leche descremada al 12% (Sam Regim, SanCor, Argentina) en solución de CaCl<sub>2</sub> 30 mM, conteniendo 0,1% de azida sódica como inhibidor del crecimiento microbiano. La mezcla de reacción consistió en 100 µl de preparación enzimática por cada ml de leche y se incubó a 30°C hasta observar la formación de un coágulo macroscópico. Se empleó cuajo bovino comercial (Chr. Hansen SAIC, Quilmes, Argentina) para realizar los controles positivos de coagulación y buffer de extracción para los controles negativos.

##### **Preparación de caseinatos**

Se prepararon caseinatos por precipitación isoeléctrica mediante acidificación a pH 4,25 con HCl 6M siguiendo el método de Souza y Malcata (16) a partir de leche de vaca pasteurizada descremada (SanCor). La mezcla se mantuvo con agitación a 37°C durante 30 minutos. Las caseínas se recuperaron por filtración sobre papel de filtro y se lavaron varias veces con agua destilada. Los precipitados se resuspendieron en agua desionizada ajustando el pH a 7,0 con NaOH 1,0 M. Cada suspensión fue mantenida a 4°C durante 2 horas para luego ser liofilizada y almacenada.

##### **Purificación cromatográfica de caseínas bovinas (FPLC)**

Se utilizó un equipo FPLC con una columna XK 16/40, rellena con 24 mL de DEAE Sepharose Fast Flow (General Electric Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK). La columna fue equilibrada con buffer Tris-HCl 20mM de pH 7,0 (mediado a 20°C) conteniendo urea 4,5 mM; imidazol 0,01M y DTT 0,05% p/p. Luego se sembró el caseinato resuspendido en el mismo buffer a una velocidad de flujo de 1 mL/min, se lavó con un volumen de columna



y se eluyó con un gradiente lineal de ClNa (0-0,4 M) en el buffer de partida a una velocidad de 0,5 ml/min y se recogieron fracciones de 3 mL.

#### Determinación del contenido en proteínas

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford empleando una curva de calibración realizada con albúmina bovina (Sigma Chemical Co.) en el rango de 100-900 µg de proteína/mL (17).

#### Hidrólisis de caseínas

Se realizaron hidrólisis usando caseinato de sodio (10 mg/mL) y las fracciones de α- y β-caseínas purificadas cromatográficamente desaladas y concentradas (1,6 mg/mL y 1,2 mg/mL, respectivamente) disueltos en buffer fosfatos 100 mM de pH 6,5. Las hidrólisis de las muestras se realizaron en tubos tipo eppendorf de 1,5 mL termostatzados a 30°C siguiendo la técnica descrita por (10). Se utilizaron las enzimas de *Silybum*

*marianun* y una dilución de cuajo comercial con una actividad coagulante equivalente. Cada mezcla de reacción consistió en 45µl de enzima y 450µl del respectivo sustrato (caseinato, α- o β-caseína). La reacción se detuvo a distintos tiempos: 30, 60, 180 y 360 minutos colocándolas en un fast-freezer. En el caso del cuajo los tiempos de reacción fueron 30 y 360 min. Simultáneamente se realizaron los ensayos blanco donde la enzima fue reemplazada por 45µl de H<sub>2</sub>O destilada.

	Volumen (ml)	Proteínas (mg/ml)	Proteínas (mg)	Rendimiento (%)
Caseinato	11	8,76	96,32	100
Fracción III (α-CN)	10	1,56	15,63	16.2
Fracción II (β-CN)	8	1,23	9,84	10.2
Fracción I (κ-CN)	8	0,37	2,98	3.1

Tabla 1: Esquema de purificación.  
Table 1: Purification scheme.

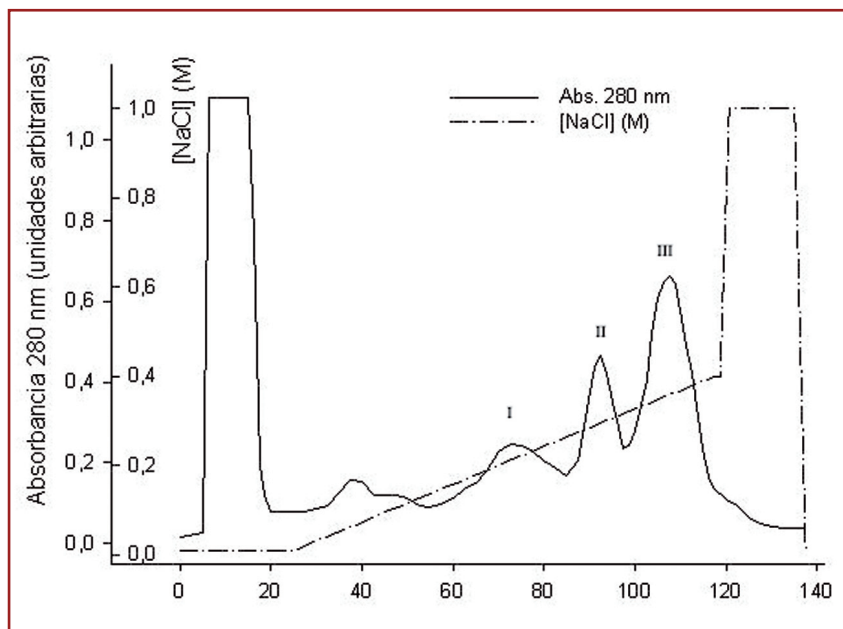


Figura 1.- Cromatografía de intercambio aniónico (Sephacrose FF). Muestra: 0,13 g de caseinato de sodio; gradiente de NaCl 0,0 a 0,4 M; velocidad de elución 0,5 ml/min; tiempo de elución 210 min.

Figure 1.- Anion exchange chromatography (Sephacrose FF). Sample: 0.13g of sodium caseinate; gradient: 0.0 to 0.4 M NaCl; elution flow rate: 0,5 ml/min; elution time 210 min.

#### Perfil hidrolítico

Se realizaron electroforesis siguiendo el método de Schägger y von Jagow (18) de tricina-SDS-PAGE utilizando una celda Mini Protean III (Bio Rad, Hercules, CA, U.S.A.). Las electroforesis se desarrollaron a 30 V para el gel de stacking (4%T, 3%C) y 100 V para el gel de resolución (16,5%T, 3%C). Los geles se tiñieron con Coomassie Blue G-250 (Bio Rad Bulletin, 2003). La cuantificación de caseínas no degradadas y de los péptidos generados se realizó por escaneo de los geles y obtención de los densitogramas correspondientes mediante el software Scion Image Beta 4.02 para Windows (Scion Corporation, Frederick, Maryland 21701, USA).

#### Resultados y discusión

Los extractos obtenidos a partir de flores de *Silybum marianum* mostraron actividad coagulante de leche, el tiempo de coagulación fue de  $45 \pm 1$  min. Se ha demostrado mediante la utilización de inhibidores específicos de grupo que las peptidasas contenidas en el extracto crudo responsables de la actividad coagulante de leche son aspartilendopeptidasas (9). Al mismo grupo mecanístico pertenece la quimosina, enzima de origen animal utilizada habitualmente para la obtención de quesos. Para obtener las fracciones α-, β- y κ- caseína, un caseinato que conte-

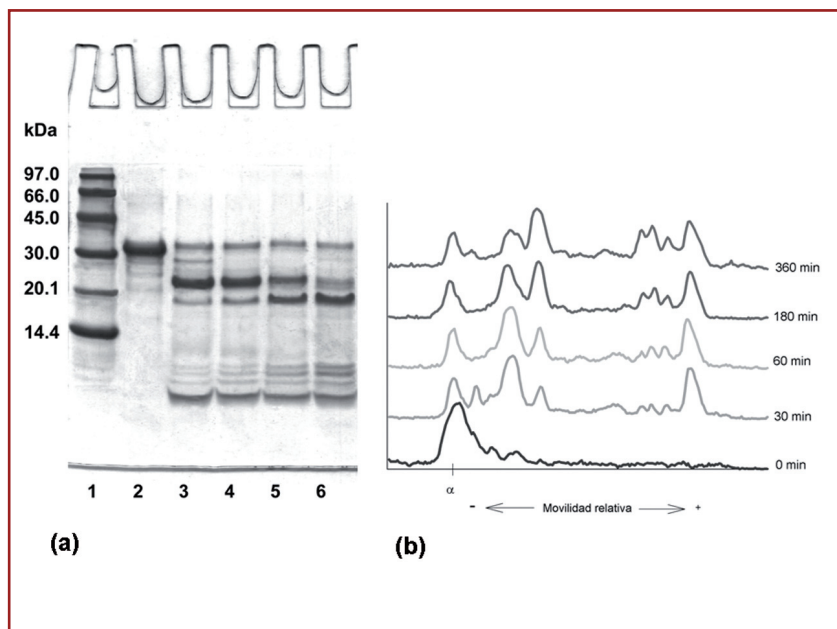
Marzo | 421  
Alimentaria | 2011

nía 8,8 mg de proteína/mL fue purificado utilizando un proceso cromatográfico sencillo de un solo paso. Al ser las caseínas muy similares en tamaño no pueden ser separadas por exclusión molecular, por lo que se llevó a cabo una cromatografía de intercambio aniónico en presencia de urea 4,5 M y un pH cercano a la neutralidad (Figura 1). Esta metodología permitió la separación de las fracciones  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseína con una mayor homogeneidad electroforética que las de origen comercial. Este método es preferible al que utiliza un intercambiador catiónico, que requiere urea en alta concentración (8 M) y un pH de trabajo menor a 3,5 (19, 20). De acuerdo al esquema de purificación desarrollado, las  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseínas fueron purificadas con un rendimiento de 16,2; 10,2 y 3,1% respectivamente. La magnitud de estos porcentajes está de acuerdo con la cantidad de cada una de estas fracciones presentes en la leche (Tabla 1).

Se obtuvieron hidrolizados de las fracciones  $\alpha$ - y  $\beta$ -caseína purificadas *cromatográficamente* y del caseinato total mediante la acción de aspartilendopeptidasas de *S. marianum*.

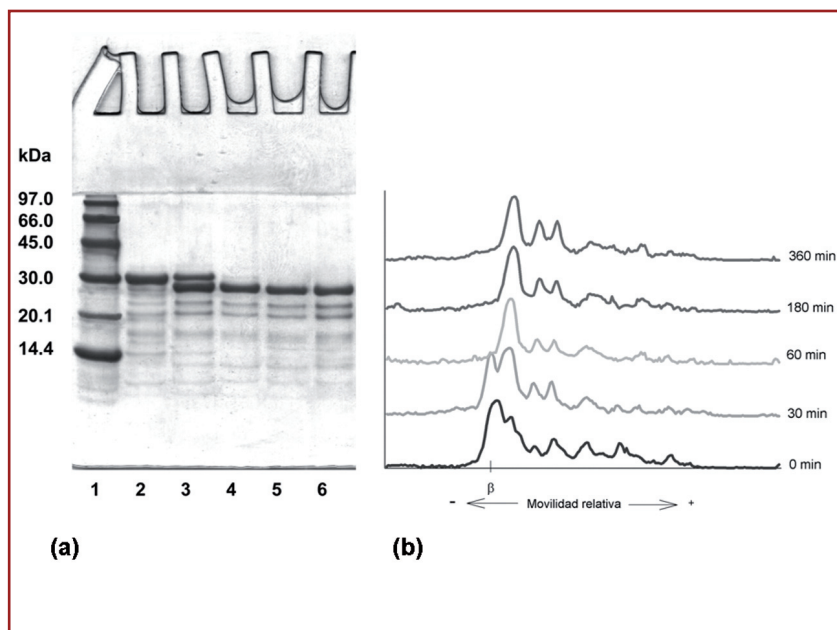
En la Figura 2 se muestra la hidrólisis de la fracción  $\alpha$ -caseína. Se observa que a los 30 minutos de reacción se degrada el 64% de la misma. Al mismo tiempo aparecen bandas de menor masa molecular (24, 19 y 6 kDa). La de 24 kDa va hidrolizándose a medida que aumenta el tiempo de incubación, mientras que la banda de 19 kDa se va intensificando y, la banda de 6 kDa se mantiene constante en intensidad desde los 30 minutos hasta las 6 horas de reacción.

La hidrólisis de la fracción  $\beta$ -caseína se muestra en la Figura 3. Esta fracción sufre una intensa hidrólisis y se torna no detectable tras la primera hora de reacción. A los 30 minutos de incubación aparece una



**Figura 2.- a:** Electroforesis (Tricina SDS-PAGE) de los productos de hidrólisis de la fracción  $\alpha$ -caseína: Calle 1: marcadores de peso molecular, calles 2, 3, 4, 5 y 6: tiempos de hidrólisis 0, 30, 60, 180 y 360 minutos respectivamente. **b.** Densitograma de la electroforesis.

**Figure 2.- a:** Hydrolytic profile of  $\alpha$ -casein by Tricine SDS-PAGE electrophoresis: Line 1: molecular weight markers, line 2, 3, 4, 5, 6: 0, 30, 60, 180 and 360 min. of hydrolysis. **b.** Densitogram.



**Figura 3.- a:** Electroforesis (Tricina SDS-PAGE) de los productos de hidrólisis de la fracción  $\beta$ -caseína: Calle 1: marcadores de peso molecular, calles 2, 3, 4, 5 y 6: tiempos de hidrólisis 0, 30, 60, 180 y 360 minutos respectivamente. **b.** Densitograma de la electroforesis.

**Figure 3.- a:** Hydrolytic profile of  $\beta$  casein by Tricine SDS-PAGE electrophoresis: Line 1: molecular weight markers, line 2, 3, 4, 5, 6: 0, 30, 60, 180 and 360 min. of hydrolysis. **b.** Densitogram.

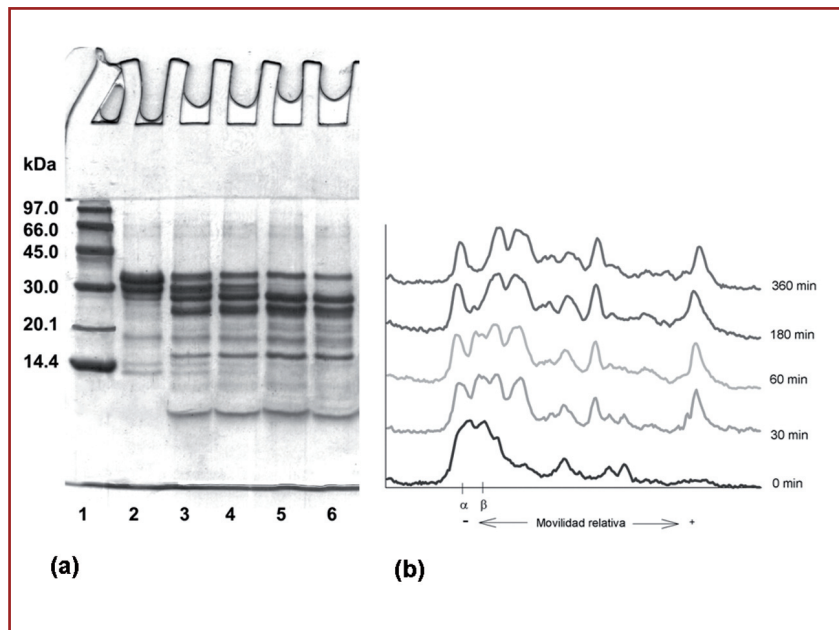


banda importante de menor masa molecular (31 kDa); que permanece inalterada hasta los 360 minutos de reacción. Al mismo tiempo se visualizan bandas de 27 y 23 kDa que se intensifican con el transcurso de la hidrólisis. Se ha postulado que la ruptura de la  $\beta$ -caseína por quimosina ocurre de manera secuencial (21).

En la Figura 4 se observa la hidrólisis del caseinato. A los 30 minutos de incubación aparecen bandas de masa molecular aproximada de 29 kDa y 25 kDa que podrían provenir de la hidrólisis de  $\beta$ -caseína y de  $\alpha_s$ -caseína respectivamente. Otras fracciones (7 y 19 kDa) que provendrían de la hidrólisis de  $\alpha_s$ -caseína aparecen al mismo tiempo y se mantienen constantes hasta las 6 horas de reacción. La fracción  $\beta$  es rápidamente hidrolizada y no se detecta a partir de los 180 minutos de reacción, al mismo tiempo que aparece una banda de alrededor de 22 kDa que se intensifica a las 6 horas de reacción. Se observa también una banda nueva de peso molecular 17 kDa que no fue detectada en las electroforesis de las caseínas purificadas.

La  $\beta$ -caseína tuvo un comportamiento diferente al estar purificada o formando parte del caseinato. En el primer caso, su degradación fue casi total (92%) luego de 60 minutos de reacción, pero cuando formaba parte del caseinato su degradación fue más lenta (48% los 60 minutos de reacción). Sin embargo, a los 360 minutos la degradación de la  $\beta$ -caseína pura y en el caseinato fue similar (97% y 90%, respectivamente).

Se comparó el comportamiento hidrolítico con el del cuajo bovino comercial utilizando una dilución tal que el tiempo de coagulación de la leche resultara similar al obtenido con las fitopeptidasas. En dichas condiciones la preparación comercial no hidrolizó de manera apreciable las fracciones  $\alpha_s$ - y  $\beta$ -caseínas purificadas; pero cuando se utilizó el



**Figura 4.- a:** Electroforesis (Tricina SDS-PAGE) de los productos de hidrólisis del caseinato de sodio: Calle 1: marcadores de peso molecular, calles 2, 3, 4, 5 y 6: tiempos de hidrólisis 0, 30, 60, 180 y 360 minutos respectivamente. **b.** Densitograma de la electroforesis.

**Figure 4.- a:** Hydrolytic profile of whole sodium caseinate by Tricine SDS-PAGE electrophoresis: Line 1: molecular weight markers, line 2, 3, 4, 5, 6: 0, 30, 60, 180 and 360 min. of hydrolysis. **b.** Densitogram.

caseinato como sustrato, el cuajo bovino produjo una fracción de peso molecular aproximado de 17 kDa que permanece hasta los 360 minutos de hidrólisis (datos no mostrados). Sin embargo, se ha reportado que el cuajo bovino es capaz de hidrolizar tanto  $\alpha_s$ - como  $\beta$ -caseínas en solución y que, probablemente, en las condiciones de ensayo no se detecte dicha hidrólisis debido a la dilución utilizada. El ataque por parte de la quimosina ocurre en un número específico de sitios en ambas caseínas, aunque no posean el enlace Phe105-Met106 en su estructura (21). La  $\alpha_s$  caseína es el principal blanco para proteólisis en los quesos elaborados con rennets comerciales (22).

Se puede concluir que las fracciones de  $\beta$ -caseína tanto puras como en el caseinato fueron más susceptibles que las de  $\alpha_s$ -caseína frente a la proteólisis por las aspartilendopeptidasas de *Silybum marianum*. Este comportamiento se diferencia del re-

portado para extractos de *Centaurea calcitrapa* y *Cynara cardunculus* (23, 24); pero es similar al de la proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (25). En general, se conoce que las peptidasas aspárticas tienen preferencia de corte por los aminoácidos hidrofóbicos, sin embargo también tienen importancia las interacciones con los aminoácidos vecinos a la unión escindible (26). Ha sido comunicado que las proteasas de *Silybum marianum* escinden el enlace Leu99-Arg100 en la  $\alpha_s1$ -caseína de leche ovina (10). Cabe destacar que los hidrolizados provenientes de caseínas puras presentan bandas adicionales que no aparecen en los productos de hidrólisis del caseinato. Esto puede deberse al hecho de que existe una menor interacción entre las diferentes fracciones proteicas, lo que permite que los sitios de corte queden más expuestos.

Los perfiles hidrolíticos muestran una actividad diferencial y específica



Marzo | 421  
Alimentaria | 2011

para cada sustrato sin excesiva proteólisis. Dada la baja actividad proteolítica mostrada por el extracto crudo de *Silybum marianum*, éste podría ser ensayado como sustituto de cuajo para la producción de quesos con características organolépticas particulares y de mayor valor agregado. Asimismo, los productos de hidrólisis podrían ser evaluados como fuente de péptidos bioactivos o productos nutraceuticos, ya que los péptidos derivados de caseína tienen interesantes aplicaciones como suplementos dietarios en alimentos y como preparaciones farmacéuticas. Un péptido puede poseer más de una función biológica y, además, se han encontrado secuencias sobrepuestas de péptidos con diferentes funciones formando parte de la estructura de las caseínas (27, 28). Las posibilidades de diseñar nuevos productos dietarios y drogas de origen natural resultan prometedores (14).

## Bibliografía

- 1.- Walsh, G. Proteins. Biochemistry and Biotechnology. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd., pp. 393-417, 2004.
- 2.- Reis, P. M.; Lourenço, P. L.; Domingos, A.; Clemente, A. F.; Pais, M. S.; Malcata, F. X. Applicability of extracts from *Centaurea calcitrapa* in ripening of bovine cheese. *International Dairy Journal*, 10: 775-780, 2000.
- 3.- Silva, S. V.; Malcata F. X. On the activity of cardosin B, a plant proteinase, on ovine caseins. *Food Chemistry*, 67: 373-378, 1999.
- 4.- Verissimo, P. C.; Esteves, C.; Faro, C. J.; Pires, E. M. The vegetable rennet from *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin-like and pepsin-like specificities. *Biotechnology Letters*, 17: 614-645, 1995.
- 5.- Vieira, M.; Pissarra, J.; Verissimo, P.; Castanheira, P.; Costa, Y.; Pires, E.; Faro, C. Molecular cloning and characterization of cDNA encoding cardosin B, an aspartic proteinase accumulating extracellularly in the transmitting tissue of *Cynara cardunculus* L. *Plant Molecular Biology*, 45: 529-539, 2001.
- 6.- Lahl, W.J.; Brown, S.D. Enzymatic production of protein hydrolyzates for food use. *Food Technol.*, 48: 68-71, 1994.
- 7.- López, L.M.I., A. Brullo, C.L. Natalucci, N.O. Caffini, D. Sorgentini, and J. Wagner. Thermal behavior, solubility and structural properties of soy concentrate hydrolyzed by new plant proteases. *Journal of Food Biochemistry*, 22: 125-141, 1998.
- 8.- Bruno, M.A., Lazza, C.M., Errasti, M.E., López, L.M.I., Caffini, N.O. and M.F. Pardo Milk Clotting and Proteolytic Activity of an Enzyme Preparation from *Bromelia hieronymi* Fruits. *LWT Food Science and Technology*, 43: 695-701, 2010.
- 9.- Vairo Cavalli, S.; Claver, S.; Natalucci, C.; Priolo, N. Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action on bovine caseinate. *Journal of Dairy Research*, 72: 271-275, 2005.
- 10.- Vairo Cavalli, S.; Silva, S. V.; Cimino, C. V.; Malcata, F. X.; Priolo, N. Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers. *Food Chemistry*, 106: 997-1003, 2008.
- 11.- Frøkjær, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Technol.*, 48: 86-8, 1994.
- 12.- Steinke, F.H.; Waggle, D.H.; Volgarev, M.N. New protein foods in human health: nutrition, prevention and therapy. CRC Press, 1992.
- 13.- Busuico, L.; Dreborg, S.; Einarsson, R.; Giampietro, P. G.; Høst, A.; Keller, K. M.; Strobel, S.; Whan, U. Hydrolysed cow's milk formulae. Allergenicity and use in treatment and prevention. *Pediatric Allergy and Immunology*, 4: 101-111, 1993.
- 14.- Silva, S. V.; Malcata, F. X. Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15: 1-15, 2005.
- 15.- López-Expósito, J.A. Gómez-Ruiz, L. Amigo, I. Recio. "Identification of antibacterial peptides from ovine alpha s2-casein". *International Dairy Journal* 16:1072-1080, 2006.
- 16.- Souza, M. J.; Malcata, F. X. Proteolysis of ovine and caprine caseins in solution by enzymatic extracts from flowers of *Cynara cardunculus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 22: 305-314, 1998.
- 17.- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254, 1976.
- 18.- Schagger, H.; von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166: 368-379, 1987.
- 19.- Andrews, A.T.; Taylor, M.D.; Owen, A.J. Rapid analysis of bovine milk proteins by Fast Protein Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, 348: 177-1185, 1985.
- 20.- Strange, E.D.; Malin, E.L.; Van Hekken, D.L.; Basch, J.J. Chromatographic and electrophoretic methods used for analysis of milk proteins. *Journal of Chromatography* 624: 81-102, 1992.
- 21.- Dagleish, D.G. The enzymatic coagulation of milk. En: *Advanced Dairy Chemistry I: Proteins* (PF Fox, ed.), 2da Edn. Elsevier Applied Science. Elsevier Science Publishers Ltd. England. pp.: 579-619, 1992.
- 22.- Fox, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, 72: 1379-1400, 1989.
- 23.- Tavaría, F. K., Sousa, M. J., Domingos, A., Malcata, F. X., Brodelius, P., Clemente, A. & Pais, S. Degradation of caseins from milk of different species by extracts of *Centaurea calcitrapa*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45: 3760-3765, 1997.
- 24.- Silva, S.V.; Barros, R.M.; Malcata, F.X. Hydrolysis of caseins by extracts of *Cynara cardunculus* precipitated by ammonium sulfate. *Journal of Food Science*, 67: 1746-1751, 2002.
- 25.- Albillos, S.M.; Busto, M.D.; Perez-Mateos, M.; Ortega, N. Analysis by capillary electrophoresis of the proteolytic activity of a *Bacillus subtilis* neutral protease on bovine caseins. *International Dairy Journal*, 17: 1195-1200, 2007.
- 26.- Barrett, A.J.; Rawlings, N.D.; Woessner, J.F. eds *Handbook of Proteolytic Enzymes* (2nd. Ed.), Elsevier Academic Press, London, UK. 2004.
- 27.- Meisel, H. Overview on Milk Protein-derived Peptides. *International Dairy Journal*, 8: 363-373, 1998.
- 28.- Villadóniga, C., Vairo Cavalli, S. E., Morcelle del Valle, S. R., Erraste, M. E., Bruno, M. A., Barros, M., M. Cantera A. Capítulo 20: Productos bioactivos obtenidos por hidrólisis (nutraceuticos y alimentos funcionales), en: *Enzimas proteolíticas en Vegetales Superiores: Aplicaciones Industriales*, ed.: N. Caffini. Editorial: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo- CYTED, pp. 273-289, 2009.