

F. Javier Moreno y Rosina López-Fandiño

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

*Tel. 915622900 Fax 915644853*

*E-mail: [j.moreno@ifi.csic.es](mailto:j.moreno@ifi.csic.es) y [rosina@ifi.csic.es](mailto:rosina@ifi.csic.es)*

### **1. Características generales del caseinmacropéptido bovino.**

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

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

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

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

Como se observa en la tabla 1, se han descrito hasta 11 variantes genéticas para la  $\kappa$ -caseína, siendo las variantes A y B las más frecuentes en leche bovina. Estas variantes se diferencian por dos sustituciones aminoacídicas: Thr<sup>136</sup> y Asp<sup>148</sup> en la variante A, por Ile<sup>136</sup> y Ala<sup>148</sup> en la variante B. Respecto al grado de fosforilación, se han descrito tres lugares posibles de modificación. La Ser<sup>149</sup> siempre está fosforilada, por lo que todas las moléculas de CMP bovino contienen, al menos, un grupo fosfato (Vreeman y col., 1986; Mollé & Léonil, 1995; Rasmussen y col., 1997). Debido a que se han identificado formas de CMP bovino difosforilado, aunque en unos niveles mucho más bajos que la forma monofosforilada, se ha propuesto un posible segundo lugar de fosforilación en la Ser<sup>127</sup> que, a diferencia de la Ser<sup>149</sup>, sólo se encuentra parcialmente fosforilada. Además, Mollé & Léonil (1995) identificaron CMP bovino trifosforilado, aunque no determinaron el tercer lugar de fosforilación. Las formas mono-, di- y tri-fosforiladas fueron cuantificadas y supusieron un 78%, 20% y 2%, respectivamente.

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

Estos carbohidratos se unen a la cadena peptídica a través de enlaces O-glicosídicos entre la GalNAc y los residuos de Ser o Thr. Todos los lugares potenciales de glicosilación de la  $\kappa$ -caseína se encuentran en la región perteneciente al CMP. Así, los residuos Thr<sup>131</sup>, Thr<sup>133</sup>, Thr<sup>136</sup> (variante A), y Thr<sup>142</sup> parecen ser los lugares de glicosilación más importantes, aunque también han sido propuestos como lugares potenciales de glicosilación los residuos Thr<sup>165</sup>, Thr<sup>135</sup> y Ser<sup>141</sup> (Kanamori y col., 1980; Pisano y col., 1994; Takeuchi y col., 1985; Zevaco & Ribadeau-Dumas, 1984). Más recientemente, se ha procedido a la identificación de los lugares de glicosilación por técnicas proteómicas lo que ha permitido revelar que los principales residuos glicosilados son Thr<sup>131</sup>, Thr<sup>142</sup> y Thr<sup>133</sup> (Holland y col., 2004). La microheterogeneidad del CMP a nivel glicosídico no sólo engloba la diversidad de estructuras de oligosacáridos, sino también el número y la localización de estas estructuras a lo largo de la cadena polipeptídica. Así, Mollé & Léonil (1995), identificaron hasta 14 formas glicosiladas diferentes de CMP bovino de la variante genética A, además de las formas no glicosiladas.

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

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

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

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

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

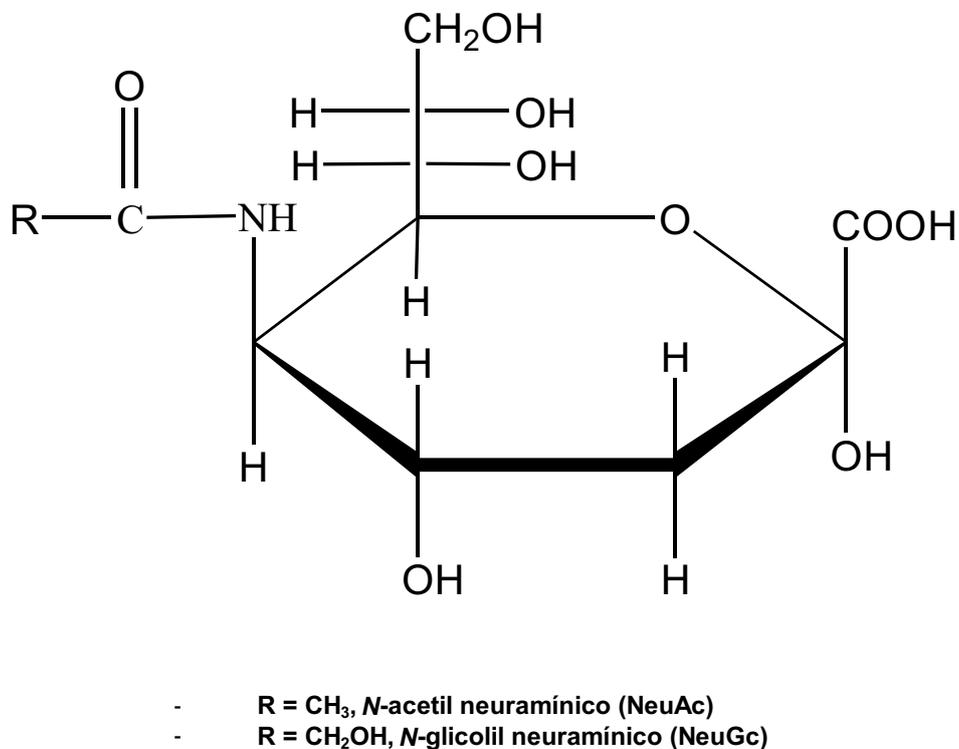
Respecto a su producción recombinante, se ha obtenido CMP humano no-glicosilado expresado en *Escherichia coli* con un elevado rendimiento (Liu y col., 2008). Además, se ha obtenido CMP humano glicosilado recombinante empleando levaduras, aunque el grado de glicosilación resultante fue sensiblemente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

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

## **2. Bioactividad del caseinmacropéptido glicosilado.**

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **4. Conclusiones**

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

#### **Agradecimientos**

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

**Referencias**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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