



Yogures adicionados con caseinomacropéptido: Estudio de la actividad anticariogénica

Yogurts added with caseinomacropptide: Study of anticariogenic activity.

Presentación: 13/06/2021

Aprobación: 10/08/2021

Sofía E. Perret

Instituto de Lactología Industrial (Universidad Nacional del Litoral - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Facultad de Ingeniería Química - Santiago del Estero 2829, Santa Fe - Argentina.
sofi.perret@hotmail.com.ar

Claudia I. Vénica

Instituto de Lactología Industrial (Universidad Nacional del Litoral - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Facultad de Ingeniería Química - Santiago del Estero 2829, Santa Fe - Argentina.
clauvenica@fiq.unl.edu.ar

María C. Perotti

Instituto de Lactología Industrial (Universidad Nacional del Litoral - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Facultad de Ingeniería Química - Santiago del Estero 2829, Santa Fe - Argentina.
cperotti@fiq.unl.edu.ar

Irma V. Wolf

Instituto de Lactología Industrial (Universidad Nacional del Litoral - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Facultad de Ingeniería Química - Santiago del Estero 2829, Santa Fe - Argentina.
vwolf@fiq.unl.edu.ar

Resumen

El caseinomacropéptido es un grupo de péptidos glicosilados que contienen ácido siálico; a los mismos se le adjudican actividad anticariogénica. En el presente estudio se formularon a escala laboratorio tres yogures (experimentales) adicionados de ingredientes fuentes de estos péptidos: concentrado de proteínas de suero al 80% y caseinomacropéptido en diferentes niveles, los cuales se compararon con un yogur (control) conteniendo sólo leche en

polvo descremada. A los 21 días se determinó la composición fisicoquímica, ácido siálico y actividad anticariogénica, esta última con un test de desmineralización *in vitro* empleando hidroxiapatita como modelo dental y dos buffers erosivos. Los yogures presentaron parámetros fisicoquímicos normales y niveles de ácido siálico en el rango entre 28,4 y 431,7 µg/g. La protección realizada por los yogures experimentales hacia el calcio y el fósforo de la hidroxiapatita fue significativamente mayor respecto al control; el valor del pH del buffer influyó en la protección.

Palabras claves: caseinomacropéptido, yogures, actividad anticariogénica.

Abstract

Caseinomacropéptide is a group of peptides attached to oligosaccharide chains containing sialic acid; they have biological activities of interest such as anticariogenic activity. In the present study, three yogurt formulations were made at laboratory-scale with the addition of ingredients source of caseinomacropéptide: whey protein concentrate at 80% and a commercial CMP at different levels, which were compared with a yogurt (control) containing only skim powder milk. Physicochemical composition, sialic acid content and anticariogenic activity were determined in the yogurts at 21 days. Anticariogenic activity was measured through a demineralization test using hydroxyapatite (HA) as the tooth model and two acidic buffers. Physicochemical parameters were considered normal for this type of products. Acid sialic levels ranged between 28,4 and 431,7 µg/g. The protection exerted by yogurts towards calcium and phosphorus of HA was significantly higher in all experimental yogurts than in control. The pH value of buffer influenced the protection.

Keywords: caseinomacropéptide; yogurts, anticariogenic activity

INTRODUCCIÓN

Caseinoglicopéptido, glicomacropéptido o caseinomacropéptido (CMP) es el nombre genérico dado a un grupo de péptidos formados durante la elaboración del queso por la acción del cuajo o quimosina (proteasa) sobre el enlace Phe 105 - Met 106 de la κ -caseína. Ellos se encuentran presentes en el suero dulce de quesería, representando el tercer grupo de componentes más abundante. El CMP es el único glicopéptido de la leche y contiene diferentes cadenas de oligosacáridos formadas por cantidades variables de ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) o ácido siálico, N-acetilgalactosamina (Gal-NAc) y galactosa (Gal), y unidas covalentemente a través de enlaces O-glicosídicos a los residuos de Ser o Thr de la cadena aminoácida (Manso and López-Fandiño, 2004; Thomä-Worringer et al., 2006).

El CMP es un péptido multifuncional con diversas actividades biológicas, entre las que pueden mencionarse: supresión de la secreción gástrica, regulación de las funciones del intestino, inhibición de la adhesión de bacterias, virus y toxinas, modulación de las respuestas del sistema inmune, incremento de la absorción de minerales, actividad anticariogénica, etc. (Brody, 2000; Thomä-Worringer et al., 2006; Córdova-Dávalos et al., 2019). Gran parte de estas bioactividades se atribuyen a la cadena de oligosacáridos enlazados al péptido (Li and Mine, 2004), y en particular a la presencia de ácido siálico, nombre genérico con el cual se designa a una familia de derivados acilados de monosacáridos carboxilados de 9 átomos de carbono (Li and Fan, 2014).

Debido a las propiedades biológicas descritas para el CMP, su presencia puede convertir a un alimento convencional en un alimento funcional.

Por otra parte, el CMP exhibe diversas características tecno-funcionales de interés alimentario, tales como la solubilidad en agua en un amplio rango de pH (entre 1 y 10), capacidad de espumar, propiedades emulsificantes y gelificantes etc.; por lo que es considerado un ingrediente ideal para la formulación de diversos alimentos (Thomä-Worringer et al., 2006; Neelima et al., 2013).

En razón de las reconocidas propiedades biológicas y tecno-funcionales, diferentes ingredientes conteniendo CMP, en particular suero dulce y productos derivados del mismo, se han utilizado en la elaboración de distintos alimentos (Marshall, 1991; Sady et al., 2007). Sin embargo, en ningún estudio se han incluido ensayos *in vitro*, *in situ* o *in vivo* que evalúen los efectos de estos péptidos en los productos formulados. En particular, no hay datos reportados sobre la relación entre presencia de CMP (o ácido siálico) en un alimento y la actividad anticariogénica del mismo.

La incidencia y la prevalencia de caries dentales es un tema de salud pública a nivel mundial. En el proceso de formación de las caries, los tejidos duros del diente sufren una descomposición y desorganización molecular, existiendo un proceso de descalcificación y disolución progresiva de los materiales inorgánicos y desintegración de su matriz orgánica por acción de los productos del metabolismo bacteriano (González Sanz et al., 2013). El esmalte dental está compuesto principalmente por cristales de hidroxiapatita (HA) de fosfato de calcio ($\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$) y una pequeña cantidad de proteínas (Kashket y DePaola, 2002). La solubilización de este material se conoce como “desmineralización” y se produce por acción de los ácidos orgánicos que liberan calcio (Ca) y fósforo (P) que son removidos de la boca por el movimiento de la saliva. En general, valores de pH por debajo de 5,5 son peligrosos para el esmalte dental. Por otra parte, la disolución del esmalte dental por acción de pH bajos (valores entre 1 y 3), como ocurre durante el consumo de alimentos y bebidas ácidas, sin una contribución microbiana, es conocida como “erosión” dental. Este proceso también provoca la disolución del Ca y P del esmalte. Por el contrario, la remineralización implica el reemplazo de minerales esenciales perdidos desde los dientes por la desmineralización (Aimutis, 2004; Nongonierma y FitzGerald, 2012).

El uso del flúor en pastas dentales y la implementación de hábitos de higiene bucal han contribuido a reducir esta problemática, sin embargo, el control de la dieta se considera actualmente como parte de las estrategias preventivas y de protección de la salud bucal. Es un hecho bien conocido que las dietas ricas en carbohidratos fermentables son un factor de riesgo, y de este modo diversos alimentos han sido evaluados para establecer si ejercen efectos protectivos o promueven el desarrollo de las caries dentales. Desde el punto de vista de la salud bucal, los alimentos pueden clasificarse en cariogénicos, no cariogénicos y cariostáticos o anticariogénicos, de acuerdo a que favorezcan, no ejerzan efecto o reduzcan la prevalencia de caries dentales, respectivamente (Wolf and Perotti, 2020).

Desde hace muchos años se viene investigando la relación entre el consumo de leche y productos lácteos y las caries dentales. Según estudios realizados en animales y humanos, diversos componentes presentes en la leche y el queso, tales como caseína, proteínas de suero, Ca, P, fracción proteasa-peptona y diversos péptidos ejercen una acción anticariogénica (Silva et al., 1987; Grenby et al., 2001; Herod, 2009; White et al., 2011). En el caso particular del yogur el foco se ha centrado en su rol en la erosión dental, con resultados contradictorios. El yogur es una bebida fermentada con un bajo valor de pH como resultado del proceso fermentativo que realizan las bacterias lácticas. En 2012, la *Academy of General*

Dentistry señaló que el yogur es una de las bebidas con potencial de causar erosión dental en personas que consumen regularmente este producto por un largo período, ya que puede disminuir el pH de la cavidad oral hasta 5,5 inmediatamente después de su consumo (Zayadi et al., 2014). Sin embargo, también se ha señalado que la capacidad de las bebidas y alimentos para resistir cambios en el pH causado por la acción buffer de la saliva ejerce también un rol importante en este proceso.

Ciertos péptidos de la leche han sido particularmente investigados por su potencial efecto protector contra la desmineralización y la erosión dental (White et al., 2011). En el caso del CMP se ha demostrado su capacidad de adsorberse sobre la HA del esmalte formando una barrera protectora de tipo física y ejerciendo propiedades quelantes y buffer que reducirían la desmineralización. Por otra parte, también se ha sugerido que el CMP previene la adhesión de bacterias cariogénicas sobre la superficie del diente alterando la composición de la placa dental y minimizando la producción de ácidos por las bacterias, con lo cual se evitaría la formación de caries (Setareh Nejad et al., 2010).

La acción de diversos péptidos bioactivos sobre el esmalte ha sido evaluado en sistemas modelo *in vitro*, *in situ* e *in vivo* (Aimutis, 2004). Diferentes protocolos fueron desarrollados dependiendo del sustrato utilizado para conducir el experimento. Los test de desmineralización usan comúnmente dientes o componentes sintéticos del material de los dientes tales como esmalte o hidroxapatita (HA). Con la aplicación del modelo de la HA se ha concluido que la acción protectora de los péptidos es dependiente de su concentración y del pH de los reactivos ácidos utilizados (Kanekanian et al., 2008; Setareh Nejad et al., 2009; 2010).

Como se mencionó anteriormente, el CMP puede encontrarse en una variedad de ingredientes de base láctea que se emplean en la formulación de alimentos. En este sentido, en la manufactura de ciertas variedades de yogur, como los batidos y firmes, es una práctica habitual la fortificación de la leche, siendo el componente más comúnmente adicionado la leche en polvo descremada (LPD). Sin embargo, en diversos trabajos se ha ensayado la adición de suero en polvo (SP), concentrados de proteínas de suero (WPC), aislados de proteínas de suero (WPI), permeados de suero, caseinatos, hidrolizados de proteínas de suero, proteínas solubles, caseinomacropéptido, entre otros (Karam et al., 2013). En general, la adición de estos componentes mejora la funcionalidad de los productos previniendo la sinéresis y defectos texturales. Además, se consigue incrementar el valor nutricional del yogur, ya que estos ingredientes pueden aportar CMP y minerales, entre otros macro y micronutrientes. En este sentido, en un trabajo previo (resultados no publicados) se evaluó el contenido de ácido siálico asociado al CMP (llamado ácido siálico libre) en una amplia variedad de ingredientes lácteos (n=27). Los niveles de este componente fueron muy variables entre las muestras, encontrándose en el rango entre 11,5 µg/g (hidrolizado de proteínas de suero) y 20.563,3 µg/g (CMP). Es importante destacar que la concentración de ácido siálico se relaciona directamente con el nivel de CMP presente (Furlanetti and Prata, 2003).

En virtud de lo expuesto, se hipotetiza entonces que es posible formular yogures con niveles incrementados de CMP y que estos productos podrían ejercer actividad anticariogénica.

OBJETIVO

Diseñar diferentes formulaciones de yogur que contengan ingredientes fuente de CMP y evaluar a través de ensayos *in vitro* la capacidad anticariogénica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Protocolo de elaboración de los yogures

Se prepararon cuatro diferentes formulaciones de yogur empleando un protocolo a escala laboratorio (500 mL). Las diferentes mezclas bases se prepararon incorporando los ingredientes proteicos en polvo, individualmente o combinados, a la leche fluida (LF) parcialmente descremada (Milkaut S.A; 1,5% de materia grasa). En función de resultados previos se seleccionó un concentrado de proteína de suero al 80% (WPC) y el CMP comercial, los cuales tuvieron altos niveles de ácido siálico. Una vez formuladas las mezclas base se dejaron hidratando en heladera por 16 h aprox. Luego, la mezcla se calentó a $85 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 20 min en baño de agua, se enfrió a $42,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y se inoculó con el cultivo starter YF-L811 (Chr. Hansen, Argentina) en la dosis recomendada por el fabricante. La incubación se llevó a cabo en un baño de agua a $42,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ hasta que el pH de la mezcla alcanzó un valor de $4,75 \pm 0,05$. Los productos obtenidos se enfriaron en baño de agua helada hasta 25°C y luego se almacenaron a 5°C durante 21 días.

El diseño de la experiencia fue el siguiente:

Y1: LF + LPD (6%)

Y2: LF + LPD (2%) + WPC (4%)

Y3: LF + LPD (2%) + WPC (3,5%) + CMP (0,5%)

Y4: LF + LPD (2%) + WPC (3%) + CMP (1%)

La formulación Y1 en la que se empleó leche en polvo descremada (LPD), ingrediente más comúnmente utilizado en la tecnología de yogur, se consideró como control (C). Las restantes formulaciones (Y2, Y3 y Y4) se denominaron experimentales. Dos réplicas de elaboración fueron realizadas en días consecutivos.

Determinaciones analíticas de los yogures obtenidos

A los 21 días de elaborados los yogures se realizaron los siguientes análisis:

Composición fisicoquímica

- **pH y acidez:** El pH se midió con un peachímetro digital (Orion 3 star benchtop, Thermo Fisher Scientific Inc., USA). La acidez titulable se determinó por titulación con una solución de 0,11N de NaOH y los resultados se expresaron como grados Dornic, ($1^\circ\text{D} = 100 \text{ mg ácido láctico/L}$).
- **Composición Global:** Se determinó sólidos totales, proteínas, grasa y cenizas. Los sólidos totales se analizaron por el método gravimétrico de secado en estufa (ISO 13580/IDF 151:2005), las proteínas por el método de Kjeldahl (ISO 8968/IDF 20-1:2014), la grasa por el método volumétrico de Gerber (Bradley et al., 1992) y cenizas por el método gravimétrico de calcinación en mufla (AOAC, Method 945.46:2007). Los resultados obtenidos para los diferentes componentes se expresaron en g/100g.
- **Capacidad de retención de agua (CRA):** Se realizó con el método de centrifugación en condiciones estandarizadas y pesada del suero liberado según Akalin et al. (2012). Los resultados se expresaron en g/100g.

Determinación del ácido siálico libre

Se analizó tanto en las mezclas bases como en los yogures a los 21 d aplicando la metodología propuesta en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas (reglamento CEE N° 2188/81), con la cual se cuantifica el ácido siálico libre. El método se basa en el tratamiento de la muestra con ácido tricloroacético (TCA), la precipitación del CMP con ácido fosfotúngstico (PTA) y su purificación con etanol. En una segunda etapa, el ácido siálico es liberado del CMP por hidrólisis con ácido sulfúrico en caliente, y finalmente reacciona con resorcinol dando un complejo coloreado que se extrae con alcohol isoamílico, leyéndose la absorbancia del complejo azul a 580 nm. La cuantificación se realiza con una curva de calibrado construida con soluciones de ácido N-acetilneuramínico (Sigma Aldrich, USA) en el rango entre 0 y 120 µg. Los resultados se expresaron en µg/g.

Los valores de los distintos parámetros determinados se expresaron como valor medio ± desviación estándar (DE) de las réplicas de elaboración.

Evaluación de la actividad anticariogénica

El procedimiento consistió en la obtención de los extractos de yogur, la aplicación del test de desmineralización empleando HA y dos soluciones buffer erosivas, y la determinación espectrofotométrica del Ca y del P solubilizado de la HA.

- **Obtención de un extracto de yogur:** Se aplicó la metodología propuesta por Ferrazano et al. (2008), que se basa en la aplicación de tres etapas de centrifugación (4000g/10 min a T=25°C) sucesivas de la muestra de yogur, partiéndose del sobrenadante de la etapa anterior. De esta manera, el último sobrenadante se encuentra enriquecido en los péptidos presentes.
- **Efecto protector de los yogures hacia la HA contra la disolución ácida:** Para la evaluación de la actividad anticariogénica de los yogures se empleó un ensayo in vitro conocido como test de desmineralización, según el protocolo propuesto por Kanekanian et al. (2008), con algunas modificaciones. Para cada muestra de yogur se siguió el esquema mostrado en la **Tabla 1**. Tubos denominados blanco y control se prepararon paralelamente por triplicado; el blanco conteniendo sólo la suspensión de HA en el buffer, de modo que no hay protección de la misma por ausencia del extracto de yogur, lo cual equivale a protección 0%, y el control conteniendo sólo el extracto de yogur, de modo que la protección equivale al 100%, ya que cómo no está presente la HA, no se produce la solubilización del Ca y P de la misma.

	HA	Buffer pH 7	Extracto de yogur
Muestra	50 mg	3 mL	2 mL
Blanco	50 mg	5 mL	-
Control	-	3 mL	2 mL

Tabla 1: Cantidades de los distintos reactivos utilizados en el test de desmineralización

Se empleó HA en polvo (Sigma Aldrich, USA). El buffer de pH=7 correspondió a una solución de Tris-HCl. Una vez preparados los tubos, los mismos se agitaron en vortex

y se dejaron en reposo por 20 min, con agitaciones intermitentes cada 5 min. Luego se centrifugaron (3000g/10 min) y los sobrenadantes se descartaron. Posteriormente se adicionó 5 mL de buffer de pH 4.2 (ácido acético/acetato) o pH 3 (ácido cítrico/citrato) y se dejó en reposo por 20 min. Finalmente los tubos se centrifugaron y los sobrenadantes se reservaron para la determinación de Ca y P.

- **Determinación de Ca y P en la solución erosiva y cálculo del % de protección:** Se analizó el contenido de Ca y P en los sobrenadantes correspondientes a la muestra, blanco y control. El Ca se determinó empleando un kit (GT Lab, Rosario, Argentina) para uso diagnóstico in vitro en suero y plasma. El método se basa en la reacción del Ca (II) a pH alcalino con la σ -cresolftaleína complexona, dando un complejo rosado cuya absorbancia se lee a 572 nm. El P se determinó según el método 991.25 de la AOAC (2007), el cual se basa en la reacción del P inorgánico con el reactivo de molibdo vanadato, dando un compuesto amarillo, cuya absorbancia se lee a 400 nm.

Considerando un valor de protección de 0% para los blancos y de 100% para los controles, la protección del yogur se calculó a través de una interpolación lineal. Los resultados se expresaron como valores porcentuales.

Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de las distintas formulaciones del yogur sobre los parámetros fisicoquímicos y CRA entre los distintos yogures se realizó un análisis de variancia (ANOVA) de una vía. Además, se aplicó ANOVA de dos vías para estudiar tanto el efecto de los factores tipo de formulación y tiempo en el contenido de ácido siálico como el efecto de los factores tipo de formulación y buffer en la protección hacia el Ca y el P de la hidroxiapatita. Las medias se compararon por el Test de Tukey con un 95% de confianza. Se utilizó el software SPSS versión 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición fisicoquímica y contenido de ácido siálico de los yogures

Los resultados de los distintos parámetros fisicoquímicos y de la capacidad de retención de agua (CRA) obtenidos para los distintos yogures a los 21 d de almacenamiento se presentan en la **Tabla 2**. Los valores de pH, acidez, extracto seco, grasa, proteínas y cenizas fueron los esperados en yogures (Tamine and Robinson, 2007). En el caso particular de la acidez, materia grasa y proteínas, la legislación (CAA, Cap VIII, art. 576) establece rangos de 0,6 a 2,0 g de ácido láctico/100 g (60 a 200 °D) para acidez, entre 0,6 y 2,9 g/100g de grasa para productos parcialmente descremados y un mínimo de proteínas lácteas de 2,9 g/100g. Como puede observarse, todos los yogures cumplieron la normativa vigente. Diferencias significativas ($P < 0,05$) fueron detectadas para el contenido de proteínas y la CRA, los cuales fueron menores en el yogur control respecto a los tres yogures experimentales. El mayor valor de proteína en los yogures experimentales se explica por la presencia de WPC en todas las formulaciones que incrementa en forma significativa los niveles de este nutriente. En el caso de la CRA, se sabe que la adición de ingredientes lácteos en yogures tales como los WPC mejora esta propiedad, con menor expulsión de suero.

	pH	Acidez (°D)	Extracto Seco (g/100g)	Grasa (g/100g)	Proteína (g/100g)	Ceniza (g/100g)	CRA g/100g
Y1	4,61±0,03a	112±1a	14,61 ± 0,18a	1,50±0,14a	4,73±0,28a	1,10±0,03a	41,8±0,9a
Y2	4,53±0,03a	114±2a	14,40 ± 0,11a	1,65±0,21a	6,12±0,25b	0,95±0,07a	59,0±3,6b
Y3	4,50±0,06a	114±1a	14,46 ± 0,12a	1,75±0,17a	6,00±0,17b	1,00±0,05a	56,1±6,1b
Y4	4,53±0,05a	115±2a	14,50 ± 0,18a	1,80±0,12a	6,39±0,34b	1,03±0,06a	55,0±5,2b

Los resultados informados son valores promedios ± DE de dos réplicas de elaboración. Diferentes letras dentro de cada columna indica diferencias significativas (P<0,05).

Tabla 2: Valores de pH, acidez, composición global y CRA de los yogures elaborados a escala laboratorio

En la **Tabla 3** se presenta el contenido de ácido siálico de las distintas formulaciones, tanto en las mezclas base (MB) como en los yogures luego de 21 d de almacenamiento.

Y1		Y2		Y3		Y4		Significancia		
MB	21-d	MB	21-d	MB	21-d	MB	21-d	F1	F2	F1xF2
17,4	28,4 ±	312,7 ±	333,2 ±	368,7 ±	397,0 ±	394,8 ±	431,7 ±	*	*	NS
± 0,8aA	1,9aB	10,9bA	8,5bB	30,6cA	31,7cB	16,1cA	11,9cB			

Los resultados informados son valores promedios ± DE de dos réplicas de elaboración MB: mezcla base; F1: tipo de formulación; F2: tiempo. Valores con diferentes letras minúsculas dentro de la misma fila difieren significativamente (P<0,05) para el factor tipo de formulación (F1). Valores con diferentes letras mayúsculas dentro de la misma fila difieren significativamente (P<0,05) para el factor tiempo (F2).

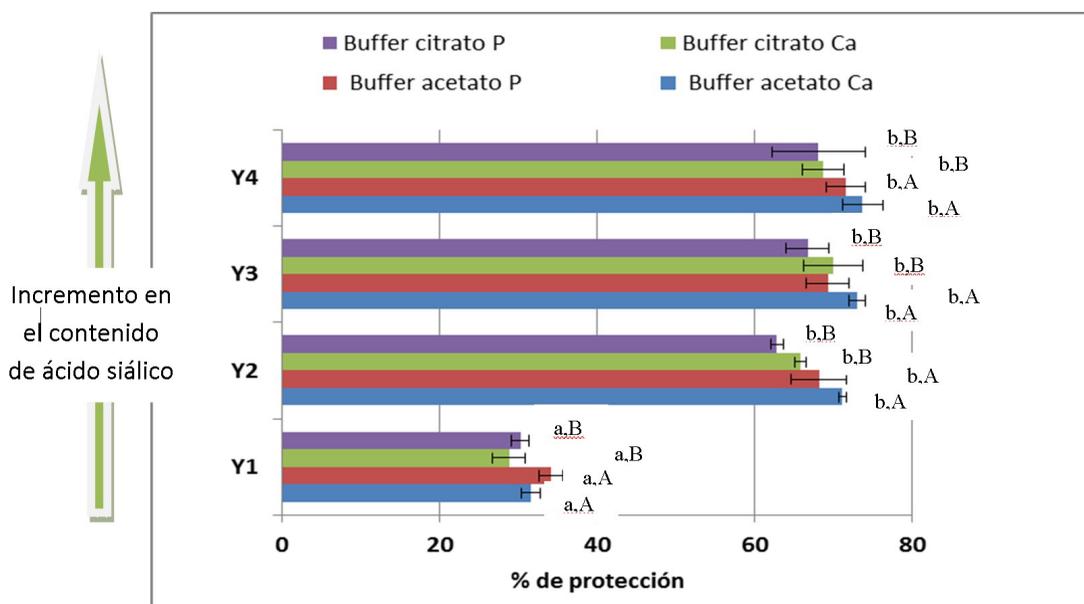
Tabla 3: Contenido de ácido siálico (µg/g) en las mezclas base y los respectivos yogures

El análisis tanto en las mezclas base como en los yogures almacenados durante 21 d se realizó para verificar que el mismo no sufriera ninguna degradación por acción química o microbiana durante dicho periodo, ya que no hay datos publicados de la estabilidad química del ácido siálico en la matriz de yogur. También se ha reportado que ciertos microorganismos podrían sintetizar este compuesto (Zhang et al., 2019). De acuerdo a los resultados obtenidos, ambos factores estudiados fueron significativos (p< 0,05), y no se evidenció interacción entre ellos. Diferencias significativas en los valores de ácido siálico se detectaron entre las formulaciones (Y4=Y3>Y2>Y1). Los elevados niveles de este componente bioactivo en los yogures experimentales se asociaron positivamente con la adición de ingredientes fuente de CMP. Por otra parte, los contenidos de ácido siálico se incrementaron (P<0,05) para cada formulación durante el almacenamiento, lo que sugeriría una probable síntesis por actividad metabólica del starter utilizado. El incremento en Y1 fue del 63% mientras que en los experimentales estuvo entre 6 y 9%.

Capacidad anticariogénica de los yogures

La actividad anticariogénica de los yogures obtenidos en las distintas experiencias se evaluó a través de un ensayo de desmineralización in vitro de la HA. Se ensayaron dos soluciones desmineralizantes: el buffer acetato (pH=4,2) y el buffer citrato (pH=3).

En el **Gráfico 1** se muestran los valores promedio \pm DE de la protección porcentual realizada por los distintos yogures sobre el Ca y el P de la HA frente a la acción desmineralizante de los buffers.



Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) para el factor tipo de formulación. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) para el factor buffer.

Gráfico 1: Porcentaje de protección de los distintos yogures (Y1, Y2, Y3 y Y4) hacia el Ca y el P de la HA frente a los buffers acetato y citrato.

El análisis estadístico reveló que los factores tipo de formulación y el valor de pH del buffer fueron significativos ($P < 0,05$); no hubo interacción entre los factores ($P > 0,05$).

El yogur control (Y1) presentó niveles de protección para el Ca y el P de la HA frente a la acción desmineralizante de los dos buffers en torno al 30%, los cuales resultaron significativamente menores ($P < 0,05$) que en los yogures experimentales.

Los tres yogures experimentales presentaron protecciones similares ($P > 0,05$), entre el 62 y el 76%, a pesar de las diferencias en los niveles de ácido siálico ($Y4 = Y3 > Y2$; $431,7 \mu\text{g/g} = 397,0 \mu\text{g/g} > 333,2 \mu\text{g/g}$).

El valor de pH del buffer influyó sobre la protección; a un menor valor de pH del buffer la protección ejercida por los yogures hacia el Ca y el P de la HA fue menor.

En el **Gráfico 2** se muestra que los incrementos en la protección respecto del yogur control Y1 fueron similares para todos los yogures experimentales, con valores entre 31 y 43%.

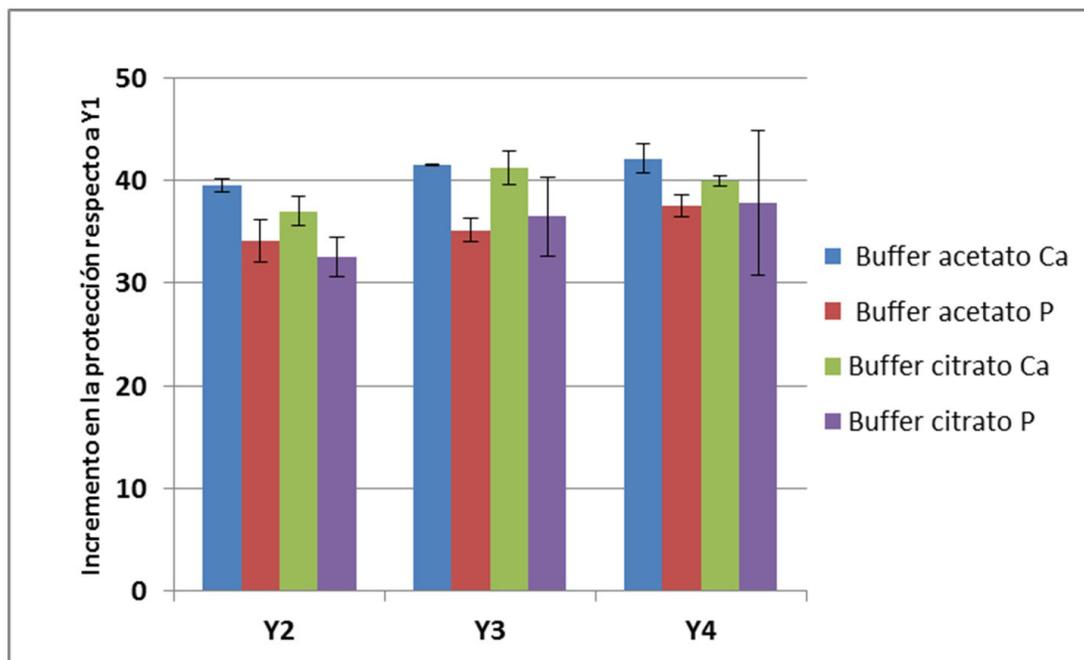


Gráfico 2: Incrementos en los % de protección de Y2, Y3 e Y4 respecto a Y1

La similitud en los perfiles de protección hacia la HA detectada en los yogures experimentales, a pesar de los diferentes niveles de ácido siálico, podría atribuirse a un efecto de saturación de los sitios de adsorción de la HA realizado por los péptidos. Se ha propuesto que péptidos como el CMP se enlazan a este material a través de grupos presentes en los mismos tales como residuos de prolina o residuos de aminoácidos ácidos, formando estructuras que se disponen espacialmente conformando una barrera física protectora sobre la superficie (Setareh Nejad et al., 2010). Según nuestro conocimiento no se encuentran publicadas investigaciones destinadas a evaluar la actividad anticariogénica de yogures enriquecidos con CMP. Hay sólo dos trabajos reportados (Setareh Nejad et al., 2009; 2010) donde se analiza el efecto de muestras de CMP comercial o preparaciones del mismo a escala laboratorio en la actividad anticariogénica. En dichos estudios se evaluó la acción erosiva de buffers de diferentes pH: 2,5, 3,0, 3,5 y 4,5. Se verificó que el CMP ejerció un efecto protector entre el 30 y el 45%, dependiendo del tipo de péptido. A bajos valores de pH (2,5) la disolución de Ca y P de la HA fue más rápida y los más altos porcentajes de protección se obtuvieron a los mayores valores de pH (4,5). Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman lo observado por otros autores. Por otra parte, en relación al efecto de la concentración de CMP en la acción protectora de la HA no se encuentran datos reportados. Sin embargo, se podrían extrapolar resultados reportados con otros péptidos bioactivos. En este sentido, Kanekanian et al. (2008) estudiaron la influencia del nivel de caseinofosfopéptidos (CPP) en la actividad anticariogénica y observaron que la protección hacia la HA incrementó exponencialmente con la concentración hasta un determinado valor (10 mg/mL), y a concentraciones superiores la actividad se incrementó muy poco.

Por otra parte, es necesario tener en cuenta que el extracto de yogur se obtuvo a partir de un proceso de centrifugación, y por lo tanto, en el sobrenadante están presentes otros

componentes además de los péptidos tales como proteínas de suero, algunas caseínas lactosa, Ca, fosfatos, y diferentes sales. Estos constituyentes podrían afectar la disolución del Ca y del P de diferente modo. Además, los mismos podrían también contribuir a la actividad anticariogénica detectada en los yogures, como ha sido señalado por distintos autores (Silva et al., 1987; Grenby et al., 2001; Warner et al., 2001; Ferrazano et al., 2008; Herod, 2009).

CONCLUSIONES

El desarrollo de alimentos funcionales es un verdadero desafío para la industria alimentaria, y se inicia con diversos estudios a escala laboratorio. En el presente trabajo nos propusimos el desarrollo de yogures con niveles incrementados de un componente bioactivo: caseinomacropéptido (CMP). Muchas de las actividades biológicas de este péptido se atribuyen a la presencia del ácido siálico, entre ellas la actividad anticariogénica.

La elaboración a pequeña escala de yogures con diferentes ingredientes fuentes de CMP solos o en combinación fue factible ya que la inclusión de los mismos no afectó los parámetros fisicoquímicos, que resultaron normales. Los contenidos de ácido siálico variaron según el ingrediente adicionado, obteniéndose yogures con concentraciones entre 11 y 15 veces mayores al yogur sin agregados.

La evaluación de la actividad anticariogénica reveló algunas particularidades. En general la protección de la HA medida a través de la disolución del Ca y del P de la misma fue significativamente superior en los yogures formulados con los ingredientes fuente de CMP respecto al control, verificándose además que en los yogures experimentales no hubo diferencias notorias en la actividad anticariogénica, sugiriendo que hay un nivel de CMP (medido por el contenido de ácido siálico) que ejerce un efecto de saturación del material. El valor de pH de los buffers afectó la disolución del Ca y el P de la HA, sugiriendo una mayor disolución de estos minerales que no es compensado por el enlace de los péptidos protectores.

En resumen, los resultados del presente trabajo indican que sería posible el desarrollo de yogures incrementados en CMP y con actividad anticariogénica. Si bien se requieren de estudios adicionales para aseverar que el consumo regular de estos productos podría reducir las caries dentales y por lo tanto contribuir a las estrategias de cuidado de la salud bucal, los datos preliminares obtenidos son alentadores.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el financiamiento de la presente investigación y a la empresa Milkaut S.A por proveernos de la leche y algunos insumos.

REFERENCIAS

- Aimutis, W. (2004). "Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis". *The Journal of Nutrition*, 134 (4), 989S-995S.
- Akalin, A. S., Ünal, G., Dinkci, N. y Hayaloglu, A. A. (2012). "Microestructural, textural, and sensory characteristics of probiotic yogurts fortified with sodium calcium caseinate or whey protein concentrate". *Journal of Dairy Science*, 95 (7), 3617-3628.
- AOAC Official Methods of Analysis (2007) (18th ed.). Method 945.46 Ash in milk. Gaithersburg: AOAC International Publisher.
- AOAC Official Methods of Analysis (2007) (18th ed.). Method 991.25 Calcium, magnesium and phosphorus in cheese. Gaithersburg: AOAC International Publisher.
- Bradley, R., Arnold, E., Barbano, D., Semerad, R., Smith, D. y Vines, B. (1992). In R. T. Marshall (Ed.). *Standard methods for the examination of dairy products* (pp. 433 -532). Washington: American Public Health Association.
- Brody, E. P. (2000). "Biological activities of bovine glycomacropeptide". *British Journal of Nutrition*, 84, 39-46.
- Córdova-Dávalos, L. E., Jiménez, M., y Salinas, E. (2019). "Glycomacropeptide bioactivity and health: A review highlighting action mechanisms and signaling pathways". *Nutrients*, 11, 1-22.
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Reglamento CEE N° 2188 (1981). Anexo IV: Presencia de suero de leche en polvo en la leche desnatada en polvo destinada al almacenamiento público mediante la determinación del ácido siálico libre, 23, 12-17.
- Ferrazano, G. F., Cantile, T., Quarto, M., Ingenito, A., Chianese, L. y Addeo, F. (2008). "Protective effect of yogurt extract on dental enamel demineralization in vitro". *Australian Dental Journal*, 53, 314-319.
- Furlanetti, A. M. y Prata, L. F. (2003). "Free and total GMP (glycomacropeptide) contents of milk during bovine lactation". *Food Science and Technology*, 23 (suppl.), 121-125.
- González Sanz, A. M., González Nieto, B. A. y González Nieto, A. (2013). "Salud dental: relación entre caries dental y el consumo de alimentos". *Nutrición Hospitalaria*, 28 (supl.4), 64-71.
- Grenby, T., Andrews, A., Mistry, M. y Williams, R. (2001). "Dental caries protective agents in milk and milk products: investigations in vitro". *Journal of Dentistry*, 29, 83-92.
- Herod, E. (2009). "The effect of cheese on dental caries: A review of the literature". *Australian Dental Journal* 36, 120-125.
- ISO 13580/IDF 151 (2005). International Dairy Federation. Yogurt - determination of total solids contents (reference method). Brussels, Belgium.
- ISO 8968-1/IDF 20-1 (2014). International Dairy Federation. Milk and milk products - determination of nitrogen content. Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation. Brussels, Belgium.
- Kanekanian, A., Williams, R., Brownsell, V. y Andrews, A. (2008) "Caseinophosphopeptides and dental protection: Concentration and pH studies". *Food Chemistry*, 107, 1015-1021.

- Karam, M. C., Gaiani, C., Hosri, C. y Burgain, J. (2013). "Effect of dairy powders fortification on yogurt textural and sensorial properties: a review". *Journal of Dairy Research*, 80 (4), 400-409.
- Kashket, S. y DePaola, D. (2002). "Cheese consumption and the development and progression of dental caries". *Nutrition Reviews*, 60 (4), 97-103.
- Li, H. y Fan, X. (2014). "Quantitative analysis of sialic acids in Chinese conventional foods by HPLC-FLD". *Open Journal of Preventive Medicine*, 4 (2), 57-63.
- Li, E. y Mine, Y. (2004). "Technical note: Comparison of chromatographic profile of glycomacropéptide from cheese whey isolated using different methods". *Journal of Dairy Science*, 87, 174-177.
- Manso, M.A. y Lopez-Fandiño, R. (2004). "k-casein macropéptides from cheese whey: physicochemical, biological, nutritional, and technological features for possible use". *Food Reviews International*, 20, 329-355.
- Marshall, S. C. (1991). "Casein macropéptide from whey - a new product opportunity". *Food Research Quarterly*, 51, 86-91.
- Neelima, Sharma, R., Rajput, Y. S., y Mann, B. (2013). "Chemical and functional properties of glycomacropéptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: a review". *Dairy Science and Technology*, 93, 21-43.
- Nongonierma, A. y FitzGerald, R. (2012). "Biofunctional properties of caseinophosphopeptides in the oral cavity". Review. *Caries Research*, 46, 234-267.
- Thomä-Worringer, C., López-Fandiño, R., y Sørensen, J. (2006). "Health effects and technological features of caseinomacropéptide". *International Dairy Journal*, 16, 1324-1333.
- Sady, M.; Domagala, J., Grega, T., y Najgebauer-Lejko, D. (2007). "Quality properties of non-fat yogurt with addition of whey protein concentrate". *Biotechnology in Animal Husbandry*, 23 (5-6), 291-299.
- Setareh Nejad, A., Kanekanian, A. y Tatham, A. (2009). "The inhibitory effect of glycomacropéptide on dental erosion". *Dairy Science and Technology*, 89, 233-239.
- Setareh Nejad, A., Kanekanian, A., Tatham, A. y Abedi, A. (2010). "The protective effect of caseinomacropéptide against dental erosion using hydroxyapatite as a model system". *International Dairy Journal*, 20, 652-656.
- Silva, M. F., Burgess, R. y Sandham, H. (1987). "Effects of cheese extract and its fractions on enamel demineralization in vitro and in vivo in humans". *Journal of Dairy Research*, 66 (10), 1527-1532.
- Tamime, A. Y. y Robinson's, R. K. (2007). *Yoghurt: Science and Technology*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.
- Warner, E., Kanekanian, A. y Andrews, A. (2001). "Bioactivity of milk proteins: 1. Anticariogenicity of whey proteins". *International Journal of Dairy Technology*, 54, 151-153.
- White, A. J., Gracia, L. H. y Barbour, M. E. (2011). "Inhibition of dental erosion by casein and casein-derived proteins". *Caries Research*, 45 (1), 13-20.
- Wolf, I. V. y Perotti, M. C. (2020). "Los productos lácteos y su rol en la salud bucal". *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 109, 50-60.

Zayadi, A., Bikarindrasari, R. y Anastasia D. (2014). “The role of yoghurt on dental erosion”. *Padjadjaran Journal of Dentistry*, 26 (1), 17-21.

Zhang, X., Liu, Y., Liu, L., Li, J., Du, G., Chen, J. (2019). “Microbial production of sialic acid and sialylated human milk oligosaccharides: advances and perspectives”. *Biotechnology Advances*, 37 (5), 787-800.