



Casa abierta al tiempo

UNIDAD IZTAPALAPA

**HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS DE LECHE POR BACTERIAS
LÁCTICAS DE LECHES FERMENTADAS**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

M a e s t r a e n B i o t e c n o l o g í a

P r e s e n t a

Ing. Itzamná Baqueiro Peña

Directora:

Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano

MÉXICO, D. F. MARZO 2006

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el No. de Registro 0471-O.

Iztapalapa, D.F. a 9 de marzo de 2006

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

Hidrólisis de proteínas de leche por bacterias lácticas de leches fermentadas

Que presentó

Ing. Itzamná Baqueiro Peña

Directora: Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano

Jurado:

Presidente: Lilia Arely de Jesús Prado Barragán

Secretario: M en C. Lorena del Carmen Gómez Ruíz.

Vocal: Dr. Humberto Hernández Sánchez

Vocal: Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del jurado

Dra. Arely Prado y Dr. Humberto Hernández Sánchez mil gracias por el tiempo y por los atinados comentarios.

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch y M en C. Lorena del Carmen Gómez Ruíz, agradezco de corazón la ayuda, tiempo y paciencia.

DEDICATORIAS

A Dios, por haberme invitado a su gran fiesta de colores y sabores, la vida.

A Sarah quien es la fuerza motriz de mi vida y quien día a día me obliga a ser mejor persona

A mis padres

A mis hermanas quienes han sido un pilar muy fuerte en mi vida.

A mis queridos sobrinos, quienes me enseñan que puede existir algo más grande que el conocimiento, la imaginación.

INDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCION	11
1.1 OBJETIVO GENERAL	13
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
1.3 HIPÓTESIS.....	13
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 COMPOSICIÓN PROTEÍNICA DE LA LECHE.....	14
2.1.1 CASEÍNAS.....	15
2.1.2 PROTEÍNAS DEL SUERO	15
2.2 LECHE FERMENTADAS	18
2.3 SISTEMA PROTEOLÍTICO DE BACTERIAS LÁCTICAS.....	22
2.4 SISTEMA PROTEOLÍTICO DE <i>S. thermophilus</i>	27
2.4.1 PROTEASAS EN <i>Streptococcus thermophilus</i>	27
2.4.2 AMINOPEPTIDASAS EN <i>Streptococcus thermophilus</i>	27
2.4.3 SISTEMA DE TRANSPORTE DE AMINOACIDOS Y PEPTIDOS EN <i>Streptococcus thermophilus</i>	29
2.4.4 ASIMILACION DE AMINOACIDOS POR <i>Streptococcus thermophilus</i> . ..	30
2.5 PÉPTIDOS BIOACTIVOS.....	31
2.5.1 PÉPTIDOS OPIOIDES	32
2.5.2 PÉPTIDOS INMUNOESTIMULADORES	33
2.5.3 PÉPTIDOS ACARREADORES DE MINERALES.....	35

2.5.4 PÉPTIDOS ANTITROMBÓTICOS.....	35
2.5.5 PÉPTIDOS BACTERICIDAS	36
2.5.6 PÉPTIDOS ANTIHIPERTENSIVOS (INHIBIDORES DE ACE)	36
2.6 PÉPTIDOS BIOACTIVOS EN LECHE Y LECHE FERMENTADAS	37
3. METODOLOGÍA.....	39
3.1 PROTEÍNAS.....	39
3.2 AISLAMIENTO DE <i>S. thermophilus</i> de LC1	39
3.3 CARACTERIZACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO.....	39
3.4 PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS PARA EL SISTEMA DE RESTING CELLS	40
3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL	41
3.6 DETERMINACIÓN DE PÉPTIDOS SOLUBLES.....	41
3.7 SISTEMA Y CONDICIONES DE REACCIÓN ENZIMÁTICA PARA MEDIR EL EFECTO DEL SUSTRATO Y pH.....	42
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	43
3.9 ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA	43
3.9.1 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE PROTEÍNAS HIDROLIZADAS	43
3.9.2 DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR	44
3.9.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	45
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
4.1 AISLAMIENTO DE <i>S. thermophilus</i> DE LC1 Y CARACTERIZACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO.....	46
4.2 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CaCl ₂ Y pH EN LA GENERACIÓN DE PEPTIDOS POR <i>S. thermophilus</i>	48

4.3 EFECTO DEL SUSTRATO Y EL pH EN LA VELOCIDAD DE GENERACIÓN DE PÉPTIDOS POR <i>S. thermophilus</i>	55
4.3.1 SUSTRATO: CASEÍNA	55
4.3.2 SUSTRATO: SEROALBÚMINA.....	59
4.3.3 SUSTRATO: LACTOFERRINA.....	62
4.3.4 SUSTRATO: WPC 80	64
4.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA POR ELECTROFORÉISIS DE LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS.....	71
5. CONCLUSIONES.....	75
6. PERSPECTIVAS.....	76
7. BIBLIOGRAFÍA	77
8. APÉNDICES.....	88
Apéndice 1. Curva patrón de crecimiento bacteriano de <i>S. thermophilus</i> de LC1 .	88
Apéndice 2. Curvas estándar de proteínas y preparación de reactivos del método de Lowry.	88
Apéndice 3 Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación de <i>S. thermophilus</i> de LC1.....	92
Apéndice 4a Preparación de soluciones para electroforéisis.	93
Apéndice 4b Técnica de electroforesis (Shahbal <i>et al</i> , 1993).....	94

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de las proteínas en la leche.....	14
Tabla 2. Clasificación de las leches fermentadas de acuerdo a su microflora dominante	19
Tabla 3. Microorganismos utilizados en la elaboración de productos lácteos fermentados	21
Tabla 4. Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche.....	34
Tabla 5. Pesos moleculares de proteínas del patrón de rango amplio	45
Tabla 6. Valores codificados y reales del diseño experimental.....	49
Tabla 7. Coeficientes estimados del polinomio (ecuación 1), de b_0 a b_5 son los coeficientes estimados a partir de las variables y sus interacciones.....	51
Tabla 8. Velocidades de generación de péptidos en caseína a diferentes valores de pH.....	57
Tabla 9. Velocidades de generación de péptidos en seroalbúmina a diferentes valores de pH.....	61
Tabla 10. Velocidades de generación de péptidos en lactoferrina diferentes valores de pH.....	63
Tabla 11. Velocidades de generación de péptidos en lactoferrina diferentes valores de pH.....	66

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía de una muestra con tinción de Gram del <i>S. thermophilus</i> , en microscópio óptico (100x).....	46
Figura 2. Cinética de crecimiento de <i>S. thermophilus</i> de LC1 en Caldo MRS a 42°C.....	47
Figura 3. Producción de péptidos a partir de caseína 1% por <i>S. thermophilus</i> aislado de LC1. Efecto de la concentración de pH y CaCl ₂ ...	50
Figura 4. Superficie de respuesta del efecto de la concentración de CaCl ₂ y pH en la generación de péptidos por <i>S. thermophilus</i> aislado de LC1 en solución de caseína al 1%.....	53
Figura 5. Gráfica de contornos del efecto del CaCl ₂ y pH en la generación de péptidos por <i>S. thermophilus</i> aislado de LC1 en solución de caseína al 1%.....	53
Figura 6. Generación de péptidos por <i>S. thermophilus</i> aislado de LC1 sobre caseína al 1% a 37°C a diferentes valores de pH.....	56
Figura 7. Generación de péptidos por <i>S. thermophilus</i> aislado de LC1 sobre seroalbúmina al 1% a 37°C a diferentes valores de pH.....	60
Figura 8. Generación de péptidos por <i>S. thermophilus</i> aislado de LC1 sobre lactoferrina 1% a 37°C a diferentes valores de pH.....	63
Figura 9. Generación de péptidos por <i>S. thermophilus</i> aislado de LC1 sobre WPC 1% a 37°C a diferentes valores de pH.....	65
Figura 10. Generación de péptidos de <i>S. thermophilus</i> aislado de LC1 sobre proteínas de leche (caseína, seroalbúmina, WPC 80, lactoferrina), al 1% (p/v) a 37°C a diferentes valores de pH.....	69

Figura 11. Electroforesis de caseína al 1% a pH 8 en gel de poliacrilamida-SDS desnaturalizante. Std= patrón de pesos moleculares, t_0-t_{60} = muestras de los diferentes tiempos de hidrólisis..... **71**

Figura 12. Electroforesis de WPC 80 al 1% a pH 7 en gel de poliacrilamida-SDS desnaturalizante. Std= patrón de pesos moleculares, t_0-t_{60} = muestras de los diferentes tiempos de hidrólisis..... **72**

Figura 13. Evolución de la concentración de proteína (WPC 80 al 1% pH 7) por análisis de las imágenes del gel de electroforesis..... **73**

RESUMEN

Las leches fermentadas han sido ampliamente estudiadas y se ha encontrado que su consumo aporta diversos beneficios a la salud. Estos beneficios están asociados principalmente a las bacterias lácticas que se utilizan en su fermentación. El sistema proteolítico de las bacterias lácticas ha sido ampliamente estudiado y es sabido que durante la fermentación de la leche se genera una gran cantidad de péptidos, de los cuales sólo algunos son metabolizados y otros se acumulan en la leche fermentada.

Los péptidos que se generan durante la fermentación de la leche como consecuencia de la hidrólisis de proteínas por las bacterias lácticas, podrían tener una contribución importante en la salud.

El objetivo de este trabajo fue demostrar que *S. thermophilus*, que es una bacteria láctica utilizada en la elaboración de leches fermentadas, posee un sistema proteolítico capaz de generar péptidos, que pueden ser precursores de péptidos bioactivos.

En este estudio se utilizó el producto comercial fermentado LC1 de Nestlé. La primera parte del estudio consistió en aislar *S. thermophilus* de la leche fermentada comercial LC1, mediante siembras sucesivas. Una vez aislado el microorganismo, se caracterizó la cinética de *S. thermophilus* en medio MRS a 42°C, ya que se ha reportado que durante la fase exponencial de crecimiento se presenta la mayor actividad proteolítica.

Se utilizó un sistema de biotransformación de “Resting cells” para probar el sistema proteolítico de la bacteria láctica. Este sistema, posee ciertas ventajas frente a una fermentación tradicional, ya que se puede tener la transformación selectiva de un sustrato definido.

Se estudió el efecto de la concentración de calcio (CaCl_2) y el pH en la actividad proteolítica de *S. thermophilus* con la ayuda de un diseño central compuesto

circunscrito, para obtener un máximo de resultados con un mínimo número de experimentos. Los péptidos solubles se cuantificaron por el método de Lowry, a lo largo de la reacción y se calculó la V_0 (velocidad de generación de péptidos). Los resultados obtenidos a partir del diseño experimental demostraron que la variación del pH tiene un mayor efecto sobre la generación de péptidos que la presencia del calcio.

En la siguiente etapa del proyecto se realizaron experimentos con diferentes proteínas de leche: seroalbúmina, lactoferrina, caseína y WPC 80 (whey protein concentrate) a diferentes valores de pH (5.5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11). Se encontró que la mayor velocidad de producción de péptidos se obtienen con el WPC 80 a pH 7, seguida por la caseína a pH 8, lactoferrina a pH 7 y seroalbúmina a pH 7.

El análisis por electroforesis de los productos obtenidos en las condiciones donde se presentó una mayor velocidad de generación de péptidos, demostró la generación de péptidos a partir de caseína y una degradación del 25% de la α -lactoalbúmina.

ABSTRACT

Fermented milks have been studied and health benefits have been reported. The benefits are associated principally to lactic acid bacteria that are used in the fermentation. Lactic acid bacteria have a complex proteolytic system capable of converting milk casein to the free amino acids and peptides necessary for growth and acid production.

The proteolytic system is composed of a proteinase which is involved in the initial cleavage of casein, peptidases which hydrolyse large peptides thus formed and transport systems which are involved in the uptake of small peptides and amino acids. Those peptides could be metabolized and others accumulated in the fermented product.

The peptides that have been generated during milk fermentation could have an important health contribution. The aim of this work is to find the proteins that could be hydrolysed by *Streptococcus thermophilus* (from LC1) to produce peptides from milk proteins. So that it can be involved in bioactive peptides production.

S. thermophilus was isolated from commercial fermented milk LC1 from Nestlé. A fermentation was characterized in order to know the log phase since at this stage the proteolytic activity is highest.

A resting cells system was used in order to assay the proteolytic activity of *S. thermophilus*. The system used has some advantage compared with a traditional fermentation because in this kind of system is possible to make a selective transformation.

The effect pH and calcium was tested over proteolytic activity by a factorial design (2^2). Soluble peptides from the reaction were measured and the rate of peptides production (V_0) calculated. The experiment demonstrated that pH had a greater effect on peptides generation than calcium presence.

Proteolytic activity on casein, lactoferrina, milk albumin and WPC 80 (whey protein concentrate) was tested at different pH (5.5, 6, 7, 8, 9, 10 and 11). Reaction with WPC80 at pH 7 showed a higher peptide production rate, followed by casein at pH8, lactoferrina at pH 7 and milk albumin at pH 7.

The electrophoretic assay showed generation of peptides from casein and the degradation of the 25% of the α - lactalbumin.

1. INTRODUCCION

Las leches fermentadas han sido consumidas por cientos de años y diversos beneficios a la salud han sido asociados al consumo de estos productos. Se han reportado en las leches fermentadas compuestos que pueden contribuir a la salud humana. Entre estos, se incluyen: los microorganismos, principalmente las bacterias usadas para la fermentación, los productos del metabolismo de ésta y los componentes derivados de la leche (Kalantzopoulos, 1997).

Ciertas cepas de bacterias lácticas, han sido reportadas como probióticos. Un probiótico se define como aquel microorganismo vivo que se ingiere como suplemento alimenticio y que tienen efectos positivos para los consumidores, ya que los probióticos pueden ejercer beneficios en el tracto digestivo, en el sistema inmunológico, en el sistema cardiovascular y en el tracto urogenital (Kalantzopoulos, 1997; Bensusan, 2002; Guarner, 2002).

El metabolismo de las bacterias lácticas tiene gran impacto en las leches fermentadas. El sistema proteolítico es complejo y eficiente, ya que este sistema es capaz de cubrir los requerimientos de nitrógeno, a través de la hidrólisis de las proteínas hasta la liberación de péptidos, los cuales pueden tener actividad biológica y contribuir a los efectos benéficos para la salud (Silva y Malcata, 2005).

Streptococcus thermophilus es una bacteria láctica ampliamente utilizada en la industria lechera, se emplea para elaborar diferentes tipos de queso y yogurt. A pesar de esta importancia, su sistema proteolítico no ha sido estudiado como el de otras bacterias lácticas (*L. delbrueckii ssp bulgaricus*, *L. lactis*, *L. casei*, entre otros).

En los últimos años, ha aumentado el interés por conocer el sistema proteolítico de este microorganismo ya que diversos productos lácteos fermentados comerciales que son probióticos, tienen además a *S. thermophilus* (LC1, Soful, entre otros).

Se ha observado que los microorganismos probióticos crecen lentamente o no llegan a crecer satisfactoriamente en la leche, por lo que una práctica común es agregar *S. thermophilus* a la fermentación (Kalantzopoulos, 1997). Debido a la actividad peptidásica de *S. thermophilus*, se han reportado relaciones simbióticas con los probióticos (Swaisgood y Clare, 2000).

Es importante conocer el papel que juega el sistema proteolítico de *S. thermophilus* en la contribución a la generación de péptidos en las leches fermentadas, ya que pueden ser precursores de péptidos con actividades biológicas, además puede contribuir a mantener viable el probiótico en el producto fermentado y contribuir a los efectos característicos de estos alimentos (Ryhänen *et al.*, 2001).

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil de hidrólisis de proteínas de leche mediante un sistema de biotransformación y cuantificar los péptidos generados por *S. thermophilus* aislado de las leche fermentada comercial LC1.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar *Streptococcus thermophilus* de la leche fermentada comercial LC1.
- Caracterizar la curva de crecimiento del *Streptococcus thermophilus* aislado.
- Determinar el efecto del ión Ca^{2+} en la generación de péptidos por *S. thermophilus*.
- Determinar el efecto del pH en la generación de péptidos por *S. thermophilus* a partir de diferentes proteínas de leche.

1.3 HIPÓTESIS

La concentración, tamaño de los péptidos producidos y la actividad proteolítica de *S. thermophilus* depende del sustrato y las condiciones de reacción

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 COMPOSICIÓN PROTEÍNICA DE LA LECHE

Las proteínas de la leche son las proteínas animales que desde hace más tiempo y en mayor cantidad ha consumido el hombre. Así mismo, debido a la facilidad con que se les puede aislar de la leche cruda, también son las mejor estudiadas e incluso se conoce la estructura primaria de su totalidad (Cheftel *et al.*, 1989).

En una leche normal el contenido medio de proteína es de 30-35 g por litro, lo que representa el 95% del nitrógeno total de la leche. En la Tabla 1 se muestra la composición de las proteínas en la leche.

Tabla 1. Composición de las proteínas en la leche (Cheftel *et al.*, 1989).

PROTEÍNA	CONCENTRACIÓN (g/ml)
Caseínas	24-28
α_{s1} -caseína	12-15
α_{s2} -caseína	3-4
κ -caseína	3-4
β -caseína	9-11
Proteínas solubles	5-7
β -lactoglobulina	2-4
α -lactoalbúmina	1-1.5
seroalbúmina	0.1-0.4
inmunoglobulina	0.6-1

2.1.1 CASEÍNAS

Alrededor del 80% de las proteínas de la leche, se encuentra bajo la forma de complejos macromoleculares con un componente mineral (especialmente fosfato de calcio) y se conocen bajo el nombre de micelas. Las caseínas están presentes fundamentalmente en esta forma y contienen hasta un 8% de constituyentes minerales. Entre estos últimos, el calcio micelar representa el 27% del calcio total de la leche, con una concentración de 1.2 g/l (30 mM).

Dentro del grupo de las caseínas, se encuentran cuatro tipos que son la α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína y κ -caseína.

Las caseínas son proteínas ácidas, por ser ricas en ácido glutámico y aspártico. En la caseína β el contenido de prolina es alto. Este aminoácido está repartido regularmente a lo largo de la cadena peptídica, lo que hace improbable la presencia de estructuras ordenadas (hélice α o estructuras β) en cantidades apreciables. Otros constituyentes como la caseína α_{s1} y la caseína β no poseen cisteína, mientras que la caseína α_{s2} y sus derivados, así como la caseína κ contienen dos residuos por molécula (Cheftel *et al.*, 1989).

Las caseínas, a causa de su estructura molecular tan particular, son fácilmente aislables por centrifugación isoeléctrica a pH 4.6. La fracción no sedimentable, llamada “proteínas solubles” o “proteínas de lactosuero” esta constituida por proteínas globulares tales como la β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, inmunoglobulinas, lactoferrina, etc. (Cheftel *et al.*, 1989).

2.1.2 PROTEÍNAS DEL SUERO

β -LAGTOGLOBULINA

La β -lactoglobulina es sintetizada dentro de las células secretoras epiteliales de la glándula mamaria bajo el control de la prolactina. Presenta de 16 a 18 aminoácidos

altamente conservados, hidrofóbicos y posiblemente forman α -hélice en residuo N-terminal (Fox, 1992).

La estructura de la β -lactoglobulina es un barril β antiparalelo formado por ocho láminas β acomodadas en dos grupos de cuatro, presenta tres giros en α -hélice. Se forma un cáliz por las dos hojas β antiparalelas en el extremo N-terminal. El extremo C-terminal presenta otro espiral antiparalelo con láminas β (Uhrínova *et al.*, 2000).

La estructura secundaria presenta alrededor de 10-50% de α -hélice y 20-30% de β -plegada. Es una proteína globular, la distribución de los residuos no polares, polares e ionizados es uniforme; los residuos hidrófobos se pueden incluir en el seno de la molécula, lo que limita las asociaciones o interacciones con otras moléculas protéicas. Las moléculas de β -lactoglobulina se pueden asociar según el pH del medio. A pH 6.6 se puede observar el dímero de esta proteína, en el rango de pH 5.2-3.5 se observa el octámero, a pH extremo (menor a 3.5 y mayor a 8), la proteína se encuentra en forma de monómero.

α - LACTOALBUMINA

La α -lactoalbúmina es un componente original de la leche, sintetizado por la glándula mamaria, pero dos veces menos abundante en la leche de la vaca. Es componente regulador de la lactosa sintetasa, la α -lactoalbúmina es una proteína globular de bajo peso molecular 14.2 kDa. Su estructura primaria presenta numerosas analogías de secuencia con la lisozima del huevo de gallina: 44 residuos de aminoácidos idénticos de 123. Además, la localización de 4 uniones disulfuro es idéntica, lo que indica la similitud de estructuras tridimensionales de estas 2 proteínas, aunque ambas catalizan la formación o ruptura de un enlace α -(1-4) oxídico, la α -lactoalbúmina no está directamente implicada en el espacio de catálisis de la lactosa sintetasa. La α -lactoalbúmina es poco susceptible a participar en cambios de enlaces disulfuro, salvo a temperatura alta por la ruptura de enlaces naturales (Cheftel *et al.*, 1989)

SEROALBÚMINA

La seroalbúmina presenta una estructura secundaria que contiene alrededor del 50-55% de α -hélice y 15-18% de β -plegada. Contiene alrededor de 200 residuos cargados, distribuidos por la molécula y contribuye al carácter hidrofílico y altamente soluble de la molécula. El punto isoeléctrico de esta proteína es de 4.7. Las albúminas se caracterizan por un bajo contenido de triptofano y metionina, presentan un alto contenido de cisteína y de aminoácidos cargados, como el aspartato, ácido glutámico y lisina (Morrisey *et al.*, 1991).

Es una proteína altamente soluble en agua (30% peso/volumen) a pH 7, permanece estable bajo variedad de condiciones ambientales y con un punto isoeléctrico de pH 5 (Morrisey *et al.*, 1991).

LACTOFERRINA

La lactoferrina es una proteína que fue aislada por primera vez de leche. Presenta un color rosáceo, se sabe que ésta se encuentra unida al hierro; además presenta características similares a la transferrina. Se ha comprobado que la lactoferrina está presente en fluidos exócrinos como saliva, bilis, fluidos pancreáticos y lágrimas. En el plasma la concentración es mucho más baja que la que se encuentra en la leche.

La lactoferrina es una proteína con peso molecular de 82 kDa, esta compuesta por 692 aminoácidos, contiene puentes disulfuro, pero no presenta grupos sulfhidrilos libres.

La cadena polipeptídica de la lactoferrina consiste en dos fracciones globulares N y C, unidos por α -hélice, estas fracciones presentan cierta susceptibilidad al ataque proteolítico. Los dos dominios son similares en la secuencia de aminoácidos, probablemente como resultado de la temprana duplicación del gen antecesor. Cada fracción presenta un sitio unido al hierro y un glicano. Sin embargo las

conformaciones de la fracción N y C son diferentes y su afinidad por el hierro es alta (Lønnerdal e Iyer, 1995).

2.2 LECHE FERMENTADAS

La fermentación de la leche para la elaboración de diversos productos es una práctica muy antigua. Existen reportes sobre la elaboración de yogurt en Mesopotamia desde hace unos 7000 años. Durante estas fermentaciones se acumulan metabolitos como el ácido láctico, el etanol y muchos otros que evitan el deterioro de la leche y le imparten características organolépticas distintivas (García-Garibay *et al.*, 2004).

Existe una amplia variedad de leches fermentadas, probablemente algunos cientos, en las que interviene un gran número de especies de bacterias lácticas y algunas levaduras. En algunos países el consumo de estos productos es superior al de la leche fresca. En ocasiones es difícil definir algunos de estos productos debido a su gran número y variedad, ya que se elaboran de diferentes formas y con distintos tipos de materia prima, ya que se utilizan leches de diferentes especies; por ejemplo vaca, oveja, cabra, camella y yegua. Es también difícil intentar una clasificación de estos productos ya que sus características pueden variar de un fabricante a otro, e incluso, particularmente en el caso de las leches fermentadas tradicionales, los microorganismos que intervienen en su elaboración pueden ser variables de acuerdo con la región, el procedimiento de inoculación y a las variaciones climáticas. En la Tabla 2 se agrupan las leches fermentadas según la principal microflora dominante.

En la Tabla 3 se presentan los microorganismos que intervienen en la elaboración de leches fermentadas. En esta tabla se incluyen los nombres recientes y antiguos, ya que los cambios de nomenclatura de estos microorganismos suelen causar confusión.

Tabla 2. Clasificación de las leches fermentadas de acuerdo a su microflora dominante (García-Garibay, 2004).

GRUPO	TIPO DE FLORA	CARACTERÍSTICAS	PRODUCTOS
I	<i>Lactococcus</i> y en algunos <i>Leuconostoc</i> (bacterias mesofílicas)	Acidez baja o moderada	Jocoque Buttermilk Leches escandinavas
II	<i>Lactobacillus</i>	Acidez moderada o alta	Leche "búlgara" Leche acidófila Yakult
III	<i>Lactobacillus</i> y <i>Streptococcus</i> (bacterias termofílicas)	Acidez moderada o alta	Yogurt Dahi Laven Bioghurt Prostokvasha Brano Gioddu
IV	Bacterias lácticas y levaduras	Acidez y alcohol	kefir Koumiss "Búlgaros"

Ilia I. Metchnikoff en el año de 1908, propuso que las bacterias lácticas se utilizaran como suplementos dietéticos, ya que él observó que el consumo de productos fermentados beneficiaba la salud. Una de las contribuciones más importantes de estos microorganismos es la de extender la vida de anaquel de los productos fermentados en comparación con el sustrato crudo. Estos alimentos fermentados, presentan además, menor riesgo de toxiinfecciones que el producto fresco, debido a los distintos compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias que intervienen en la fermentación, que inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos (Torres, 2000).

Los beneficios derivados del consumo de alimentos que contienen probióticos son ampliamente conocidos, pueden ejercer beneficios principalmente en el tracto

digestivo, en el sistema inmunológico, en el sistema cardiovascular y en el tracto urogenital (Bensusan, 2002; Guarner, 2002).

- **Tracto digestivo.** A nivel de tracto digestivo, se han reportado diversos efectos de los probióticos, tales como: Disminución de la mal absorción de la lactosa, tratamiento de varios tipos de diarrea (rotavirus, diarreas de origen bacteriano y diarreas asociadas al consumo de antibióticos), disminución de síntomas de enfermedades inflamatorias intestinales, tratamientos de infecciones en recién nacidos, problemas de úlcera péptica y prevención de cáncer de colon (Schaafsma, 2002).

- **Sistema inmunológico.** Como resultado de las investigaciones del efecto de los probióticos en el sistema inmunológico, se descubrió que el efecto se da por interacción del microorganismo con las células de la mucosa intestinal y como consecuencia se tiene un incremento de los niveles de secreción de IgA y de anticuerpos de la sangre (Schaafsma, 2002). Reportes clínicos sugieren que el consumo de leches fermentadas con bacterias probióticas pueden aliviar algunos de los síntomas de dermatitis atópica y reducir el desarrollo de alergias, posiblemente por la vía de la regulación del sistema inmune (Cross *et al.*, 2001).

- **Sistema cardiovascular.** Se ha demostrado que los péptidos inhibidores de enzima convertidora de angiotensina (ACE), formados en la leche durante la fermentación, pueden disminuir la presión sanguínea (Schaafsma, 2002).

- **Sistema urogenital.** Los probióticos ayudan a reducir las infecciones en el tracto urogenital. Tres cepas de *Lactobacillus* mostraron capacidad para colonizar la vagina y actuar como barrera de uropatógenos (Reid, 2000).

Tabla 3. Microorganismos utilizados en la elaboración de productos lácteos fermentados (García- Garibay, 2004).

Nombres recientes y/o aceptados	Nombres antiguos o sinónimos invalidados
BACTERIAS	
Género <i>Lactococcus</i>	<i>Streptococcus</i> del grupo N
<i>L. lactis</i> sp <i>lactis</i>	<i>S. lactis</i>
	<i>S. lactis</i> sp. <i>lactis</i>
	<i>S. lactis</i> sp. <i>diacetylactis</i>
	<i>S. diacetylactis</i>
	<i>S. cremoris</i>
<i>L. lactis</i> sp <i>cremoris</i>	<i>S. lactis</i> sp <i>cremoris</i>
Género <i>Lactobacillus</i>	
<i>L. acidophilus</i>	
<i>L. brevis</i>	
<i>L. casei</i> sp <i>casei</i>	<i>L. casei</i>
<i>L. delbrueckii</i> sp <i>delbrueckii</i>	<i>L. delbrueckii</i>
<i>L. delbrueckii</i> sp <i>bulgaricus</i>	<i>L. bulgaricus</i>
<i>L. delbrueckii</i> sp <i>lactis</i>	<i>L. lactis</i> , <i>L. leichmannii</i>
<i>L. fermentum</i>	
<i>L. helveticus</i>	<i>L. jugurt</i>
<i>L. kefir</i>	<i>L. caucasicus</i>
Género <i>Streptococcus</i>	
<i>S. thermophilus</i>	<i>S. salivarius</i> ssp <i>thermophilus</i>
Género <i>Leuconostoc</i>	
<i>L. lactis</i>	<i>L. citrovorum</i> , <i>S. kefir</i>
<i>L. mesenteroides</i> ssp <i>mesenteroides</i>	<i>L. cremoris</i> , <i>L. citrovorum</i>
	<i>L. mesenteroides</i>
Género <i>Bifidobacterium</i>	
<i>B. bifidum</i>	<i>Lactobacillus bifidus</i>
Género <i>Propionibacterium</i>	
<i>P. freudenreichi</i> ssp <i>shermanii</i>	<i>P. shermanii</i>
<i>P. freudenreichi</i> ssp <i>freudenreichi</i>	<i>P. freudenreichi</i>
LEVADURAS	
Género <i>Kluyveromyces</i>	
<i>K. lactis</i> var <i>lactis</i>	<i>Saccharomyces lactis</i>
	<i>K. lactis</i>
	<i>K. marxianus</i> var <i>lactis</i>
<i>K. marxianus</i>	<i>Saccharomyces marxianus</i>
	<i>S. fragilis</i> , <i>K. Fragilis</i>
	<i>K. marxianus</i> var <i>marxianus</i>
<i>K. bulgaricus</i>	<i>K. marxianus</i> var <i>bulgaricus</i>
Género <i>Candida</i>	
<i>C. kefir</i>	<i>S. kefir</i> , <i>Torulopsis kefir</i> ,
	<i>C. pseudotropicalis</i>

Las leches fermentadas son consideradas vehículos a través de los cuales, el consumidor recibe el número adecuado de bacterias probióticas. Las cuentas

deberán ser mayores a 1×10^7 ufc g^{-1} para asegurar el efecto probiótico (Vinderola y Reinheimer, 2000).

Desde el punto de vista nutricional y de la salud, las leches fermentadas aportan nutrimentos adicionales a los del producto fresco, como son vitaminas del complejo B, mayor cantidad de proteínas en productos concentrados, además las proteínas tienen mayor valor biológico debido a la prehidrólisis que sufren por las proteasas producidas por las bacterias lácticas. Las leches fermentadas son alimentos adecuados para las personas que sufren intolerancia a la lactosa, ya que la presencia de lactasas microbianas hidrolizan la lactosa tanto en el producto fermentado como en el tracto gastrointestinal cuando las bacterias se implantan en el mismo (Syndifrais, 2002).

Las leches fermentadas también contienen un gran número de compuestos con actividades biológicas que pueden contribuir a la salud humana, la hidrólisis de las proteínas por bacterias lácticas puede ser responsable de algunas de las propiedades probióticas (Kalantzopoulos, 1997).

Se ha reportado que el sistema proteolítico de las bacterias lácticas que se encuentran formando la microbiota intestinal, puede contribuir a la liberación de péptidos bioactivos. Smacchi y Gobetti (2000), encontraron que la proteólisis por bacterias lácticas en leches fermentadas y quesos contribuye a la generación de péptidos bioactivos.

2.3 SISTEMA PROTEOLÍTICO DE BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias lácticas se caracterizan por ser gram positivas, no esporuladas, producen de ácido láctico, ácido tolerantes, proliferan en habitats anaerobios, catalasa negativa, no móviles y no reductoras de nitratos. Su metabolismo de azúcares las divide en dos grupos homolácticas y heterolácticas, algunas degradan lactosa como fuente de carbono, así como vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos. (Bergey, 1978). Estas bacterias se caracterizan por tener grandes

requerimientos de factores de crecimiento, pueden usar caseína como fuente de nitrógeno, no pueden asimilar el nitrógeno inorgánico, pero son capaces de degradar proteínas y péptidos para satisfacer sus necesidades de crecimiento (Shihata y Shah, 2000; Chavagnat *et al.*, 1999; Meisel y Bockelmann, 1999; Beshkova *et al.*, 1998).

Aunque existen diferencias en la capacidad proteolítica entre las diferentes especies de bacterias lácticas, numerosas cepas son conocidas por la capacidad de crecer en sustratos ricos en proteínas como en la leche y carne. Existen dos características que diferencian a las bacterias lácticas de otros microorganismos proteolíticos. Primero, las bacterias lácticas son microorganismos con grandes requerimientos de aminoácidos y su crecimiento depende de sistemas eficientes para la degradación de proteínas y el transporte de péptidos pequeños. Segundo, muchas bacterias lácticas tienen sistemas proteolíticos altamente específicos que se refleja en la producción de péptidos únicos (Kok y de Vos, 1994).

El sistema proteolítico de las bacterias lácticas es eficiente para reducir proteínas a oligopéptidos o pequeñas cadenas de aminoácidos y proveer a las células con los aminoácidos necesarios para su crecimiento en leche.

El sistema proteolítico de las bacterias lácticas se compone de tres etapas principales:

1. La primer etapa consiste en la proteólisis de la caseína por proteasas ligadas a la pared celular para formar péptidos.

Las proteasas de las bacterias lácticas realizan el primer paso en la degradación de la caseína. Las proteasas han sido clasificadas por medio de análisis electroforético de los productos de degradación de la caseína. Las proteasas de *L. lactis*, cuyo sistema proteolítico ha sido ampliamente estudiado, se clasifican de la siguiente manera:

- Tipo P_I, que actúa sobre la β -caseína
- Tipo P_{III}, que actúa sobre la α_{s1} - κ - y β -caseína.
- Tipo P_{I/P_{III}}, que es un grupo con la especificidad de ambos grupos

Estas proteasas son específicas, por lo que han sido utilizadas para la producción de sabores en la elaboración de productos lácteos fermentados, son conocidas con el nombre de prp. Degradan la caseína de la leche para formar oligopéptidos, los cuales serán transportados a través de las membranas por el sistema de transporte de oligopéptidos (Opp) (Juillard *et al.*, 1995a; Tjwantan *et al.*, 1993).

2. En la segunda etapa, los péptidos son transportados dentro de las células por uno de los sistemas de transporte de péptidos.

3.

Las bacterias lácticas poseen una gran variedad de sistemas de transportes para péptidos y aminoácidos (Smid *et al.*, 1991).

Se han encontrado tres tipos de sistemas de transporte de aminoácidos:

- i) Transporte *pmf*, el cual se lleva a cabo por acoplamiento de fuerza protón motriz
- ii) Transporte por enlaces de alta energía, ya sea por los metabolitos derivados de ATP o por ATP mismo.
- iii) Transporte por intercambio, el cual se ve ejemplificado por el sistema arginina/ornitina (Poolman *et al.*, 1995; Kok y de Vos, 1994; Smid *et al.*, 1991).

El transporte de di- y tripéptidos se lleva a cabo por el sistema derivado de la fuerza protón motriz, el péptido atraviesa la membrana citoplasmática por medio del sistema de transporte de péptidos específico, posteriormente, el péptido es hidrolizado dentro de la célula por las peptidasas intracelulares. El sistema de transporte de di- y

tripéptidos tiene alta especificidad de sustrato y una afinidad considerable por dipéptidos que contienen prolina (Tjwantan *et al.*, 1993). Se ha sugerido que la principal función de estos transportadores es permitir simplemente excretar el exceso de aminoácidos del citoplasma para mantener una adecuada proporción (Decker, 2001).

4. Una vez dentro de la célula, los péptidos son degradados por un diverso grupo de peptidasas hasta formar aminoácidos libres, los cuales son metabolizados o asimilados en proteínas (Kranenburg *et al.*, 2002; Decker, 2001; Juillard *et al.*, 1995b).

Los péptidos generados a partir de la caseína, son posteriormente hidrolizados por una gran variedad de peptidasas (PepA, PepE, PepF, PepO, PepX), en pequeños péptidos y aminoácidos. Se ha encontrado que las peptidasas se localizan dentro de la célula y son altamente específicas (Tjwantan *et al.*, 1993). Entre las diversas peptidasas se encuentran: las, aminopeptidasas, las endopeptidasas, las dipeptidasas y las tripeptidasas.

- **Aminopeptidasas.** Las amino peptidasas son enzimas que hidrolizan péptidos por el extremo N-terminal, son ampliamente encontradas en bacterias lácticas. Las aminopeptidasas hidrolizan los péptidos en un rango de 2-12 aminoácidos y en general presentan baja actividad en dipéptidos con prolina (Decker, 2001). Entre las aminopeptidasas reportadas de bacterias lácticas se encuentran la Glutamilaminopeptidasa y la X- prolildipeptidilaminopeptidasa

- **Endopeptidasas.** Son enzimas intracelulares, frecuentemente localizadas en el citoplasma (Law y Haandrikman, 1997). Muchas de éstas son metaloenzimas que contienen dominios con uniones Zn. Algunas de éstas (PepF) tienen pH óptimos en rango alcalino 7.5 – 9 (Decker, 2001).

- **Dipeptidasas y tripeptidasas.** Estas enzimas varían con respecto a sus propiedades bioquímicas y físicas. Muchas dipeptidasas son también prolinasas e

hidrolizan los péptidos con N – ó C – terminal que presentan residuos de prolina (Decker, 2001).

Estas enzimas requieren de sustratos específicos e hidrolizan una gran cantidad de dipéptidos, tripéptidos y tetrapéptidos. Las propiedades bioquímicas y la especificidad de sustratos de enzimas aisladas de *L. lactis ssp lactis* NCRZ267 y *L. delbrueckii ssp bulgaricus*, sugieren que los péptidos generados por estas enzimas son muy similares (Tjwantan *et al.*, 1993).

Los productos liberados por las dipeptidasas y tripeptidasas son aminoácidos y pequeños péptidos (dipéptidos y tripéptidos). Para un eficiente proceso proteolítico, se requiere que estas enzimas se encuentren en cantidades importantes (Kok y de Vos, 1994; Tjwantan *et al.*, 1993).

Las proteasas presentes en los microorganismos fermentadores, hidrolizan las proteínas durante la fermentación y el almacenamiento del producto. Los cultivos de bacterias contienen una gran diversidad de enzimas proteolíticas que son responsables del rompimiento de las proteínas en péptidos y aminoácidos. Durante la fermentación de la leche, muchos oligopéptidos son liberados por la degradación de las caseínas, los cuales pueden ser precursores de péptidos con actividades biológicas (Ryhänen *et al.*, 2001).

Las proteínas de la leche son una fuente importante de péptidos bioactivos, los cuales pueden ser obtenidos *in vitro* o *in vivo*. Los péptidos bioactivos derivados de proteínas se encuentran inactivos dentro de la estructura primaria de la proteína, hasta que son liberados por proteólisis enzimática (Meisel y Bockelmann, 1999).

2.4 SISTEMA PROTEOLÍTICO DE *S. thermophilus*

El sistema proteolítico de las bacterias lácticas ha sido extensamente estudiado en los últimos años, principalmente en lactococos. La situación para *Streptococcus thermophilus* es diferente, a pesar de ser ampliamente utilizado en la industria lechera. Aunque *Streptococcus thermophilus* presenta muy baja actividad proteolítica en la pared celular, su actividad proteolítica es principalmente peptidásica (intracelular) (Rul y Monnet, 1997).

2.4.1 PROTEASAS EN *Streptococcus thermophilus*.

Aunque en la bibliografía se encuentran reportadas peptidasas de diferentes tipos, poca era la información que se tenía de las proteasas en *Streptococcus*, recientemente Fernández- Espla *et al.*, (2000), aislaron por primera vez, una proteasa ligada a la pared celular de *Streptococcus thermophilus* CNRZ 385, la enzima, una serino- proteasa, altamente activada por iones calcio, presente una especificidad intermedia entre las proteasas de lactococos, conocidas como tipo P_I y P_{III}, La enzima fue nombrada como Prt S, por ser miembros de la familia de las subtilasas.

2.4.2 AMINOPEPTIDASAS EN *Streptococcus thermophilus*.

Diversas peptidasas se han encontrado en *Streptococcus thermophilus*, oligopeptidasas, dipeptidasas y aminopeptidasas homologas a las presentes en *Lactococcus lactis*.

Las aminopeptidasas A son aminopeptidasas específicas por aminoácidos ácidos y Las PepX son X- prolyl dipeptidil aminopeptidasas específicas para prolina.

Rul *et al.*, (1995), caracterizaron una aminopeptidasa de *S. thermophilus* CNRZ 302, llamada St. PepA, esta enzima fue purificada, se determinó su masa molecular de 360 kDa y se encontró que la estructura era octamérica. Su actividad fue máxima al pH 8.5, con una temperatura óptima de 62⁰C y una alta afinidad por Zn²⁺, Co²⁺ y

Mg²⁺. Esta enzima tiene una alta especificidad por los N- terminal de los residuos ácidos de los péptidos, pero también libera serina y ácido málico y α - hidroxiaácidos homólogos del ácido aspártico.

Chavagnat *et al.*, (1999), purificaron una aminopeptidasa PepN, la cual es un monómero de 95kDa con un pH óptimo de 7 a 37⁰C. Esta enzima es fuertemente inhibida por agentes quelantes, lo que sugiere que es una metalopeptidasa. La actividad se ve fuertemente activada por cationes bivalentes como Zn²⁺, Co²⁺ y Mn²⁺. Esta enzima mostró una amplia especificidad por el N- terminal de los aminoácidos de pequeños péptidos, aunque no se observó una actividad peptidásica significativa. La secuencia genética de la PepN presenta una alta homología con otras pepN de bacterias lácticas y muestra la secuencia característica de la familia zinc metalopeptidasas.

Tsakalidou *et al.*, (1998), identificaron una Aminopeptidasa intracelular X- prolil dipeptidil aminopeptidasa en *Streptococcus thermophilus* ACA- DC 4, esta cepa fue elegida de entre 24 cepas diferentes de *Streptococcus* debido a la alta actividad que presentaba. Se observó una mayor actividad de esta enzima al final de la fase logarítmica. Durante la fase estacionaria la actividad declinaba, sugiriendo que esta enzima es degradada o inactivada en la fase estacionaria de las células. Una conducta similar se ha observado en las enzimas X- prolil- dipeptidil aminopeptidasa de *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* (Atlan *et al.*, 1990); y de *Lactococcus lactis subsp cremoris* (Yan *et al.*, 1992).

A pesar de que las X- prolil- dipeptidil aminopeptidasas de las bacterias lácticas son reportadas como serino peptidasas, muchos autores sugieren que los grupos sulfhidrilos podrían jugar un papel importante para la actividad de las enzimas (Khalid y Marth, 1990; Miyakawa *et al.*, 1994).

En un estudio realizado por Rul y Monnet, (1997), comparando las peptidasas de *Streptococcus thermophilus* CNRZ 301 con las *Lactococcus lactis* NCDO 763. A

través de cromatografía de intercambio iónico, encontraron 13 diferentes peptidasas con homologías bioquímicas. Una diferencia importante fue que *Streptococcus thermophilus* posee además dos peptidasas, una aminopeptidasa (PepS) y una oligopeptidasa.

Motoshima *et al.*, (2003), caracterizaron una aminopeptidasa presente en *S.thermophilus* YRC001, esta enzima disminuye el sabor amargo en queso.

2.43 SISTEMA DE TRANSPORTE DE AMINOACIDOS Y PEPTIDOS EN *Streptococcus thermophilus*.

Streptococcus .thermophilus posee requerimientos complejos de aminoácidos y su crecimiento se ve condicionado por la disponibilidad de sistema activo de transporte e intercambio de aminoácidos del medio del crecimiento; de los aminoácidos el ácido glutámico es esencial para el crecimiento de *Streptococcus thermophilus*.

El sistema de transporte de acarreadores de la cadena de aminoácidos no se da sin una fuente exógena de energía, lo cual indica que el *S. thermophilus* no posee reserva de energía endógena (Akpemado y Bracquart, 1983). Se han observado dos formas de acoplar la energía para el transporte de aminoácidos. 1. El ATP o metabolitos derivados del ATP son usados directamente como fuente de energía. 2. La generación de fuerza protón motriz, de acuerdo a la teoría de Mitchel. Este sistema de transporte de aminoácidos es dependiente de temperatura y pH. La temperatura óptima se encuentra entre los 30⁰ y 45⁰C y disminuye rápidamente arriba de los 50⁰C.

En *Lactococcus lactis*, se ha observado sistema de transporte de di y tripéptidos, un sistema de transporte motivado por ATP y el sistema de transporte de oligopéptidos, este sistema introduce los péptidos liberados de las caseínas por la acción de proteasas ligadas a la pared celular. Garault *et al.*, (2002), hallaron en *Streptococcus thermophilus* tres proteínas ligadas al sistema de transporte, las cuales son capaces

de acarrear péptidos de 3 hasta 23 aminoácidos, preferentemente oligopéptidos hidrofóbicos, del mismo modo que lo hace el *Lactococcus lactis*.

En el estudio realizado por Garault *et al.*, (2002), se observaron también existen dos sistemas enzimáticos para la valina e isoleucina, ya que se observan dos valores de pH, los cuales son 7 y otro alrededor de 5.

Diversos estudios sugieren que al menos existe un sistema de transporte común para el acarreador de la cadena de aminoácidos. El sistema aparentemente tiene una pequeña afinidad por los isómeros D de la leucina, isoleucina y valina, pero se observa una pequeña afinidad por la DL- norleucina. La asimilación se inhibe por la L- treonina, L- alanina, L- fenilalanina y L- cisteína. La inhibición y asimilación por L- cisteína a diferencia de la L- cistina podría deberse a la acción de los grupos sulfhidrilo.

Las cinéticas de estudio a pH 7 revelaron que existe un sistema de transporte común para tres aminoácidos y en adición se observa un constituyente específico para la leucina.

2.4.4 ASIMILACION DE AMINOACIDOS POR *Streptococcus thermophilus*.

La glutamina tiene un número importante de papeles fisiológicos para animales y humanos. Diversos estudios demuestran que la glutamina incrementa la función inmune, además es necesaria para el crecimiento de las células.

Un estudio realizado por Guimont (2002), muestra el cambio en la concentración de aminoácidos en M17 durante el crecimiento de *S. thermophilus*, observando una disminución en leucina, ácido glutámico, lisina, alanina, arginina, ácido aspártico, también se observó que la prolina disminuía muy poco durante el crecimiento del microorganismo. De entre las cepas estudiadas de streptococcus, *S. thermophilus* ITST80 mostró poco requerimiento de glicina, serina, treonina, alanina, citrulina,

ornitina y un alto consumo de asparagina. Una característica importante fue el incremento en la concentración de metionina, glutamina e histidina.

Los valores determinados para los aminoácidos libres del M17 después del crecimiento de *Streptococcus*, muestran efectos combinados de consumo, liberación e intercambio de la célula. Estos residuos liberados como aminoácidos libres después del crecimiento fueron derivados de fuentes combinadas y disponibles en exceso comparados con los requerimientos nutricionales de la célula. El uso de aminoácidos libres del medio indican que la célula es capaz de transportarlos y usarlos (Guimont, 2002).

En este estudio *S. thermophilus* ITGST80 mostró poca variación en la concentración de aminoácidos ácidos, lo que sugiere que el nivel de ATP en esta cepa es bajo, y esto también puede estar relacionado con la baja acidez que presenta esta cepa.

En comparación con otras cepas, *S. thermophilus* TGST82 mostró el valor más alto liberado de glutamina, la liberación de la glutamina se presenta a través de la fase logarítmica y esto podría estar relacionado con el sistema interno de almacén que anteriormente se había reportado por (Ikeda *et al.*, 1996; Schmitz 2000).

2.5 PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Las proteínas de la leche son una fuente importante de péptidos bioactivos, ya que se ha reportado que alrededor del 71% de los péptidos bioactivos generados en leche provienen de las caseínas, mientras que las proteínas del suero, generan alrededor del 29% de estos péptidos (Meisel, 1998).

Los fragmentos específicos de proteínas que presentan actividades biológicas y regulan procesos fisiológicos, además de su valor nutricional, son conocidos como péptidos bioactivos. Estos péptidos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a los tejidos periféricos vía circulación sistémica, para ejercer funciones específicas en el tracto gastrointestinal.

La gran diversidad de péptidos bioactivos derivados de las proteínas de leche se refleja en la Tabla 4. Los péptidos pueden ser obtenidos por hidrólisis de las proteínas mediante digestiones *in vitro*, por enzimas proteolíticas tanto de origen animal como microbiano e *in vivo* por digestión de la proteína precursora en el tracto gastrointestinal.

Los péptidos bioactivos podrían alterar el metabolismo celular y actuar como vasoreguladores, factores de crecimiento, inductores hormonales y neurotransmisores. Los péptidos bioactivos se clasifican de acuerdo a la bioactividad que ejercen en: opioides, inmunoestimuladores, acarreadores de minerales, antitrombóticos, bactericidas, antihipertensivos (Baró *et al.*, 2001).

2.5.1 PÉPTIDOS OPIOIDES

Entre los péptidos opioides se encuentran los péptidos llamados casomorfina, que son péptidos de 4-10 aminoácidos derivados de la α y la β caseína.

Los péptidos con actividad opiácea pueden tener dos tipos de efectos, agonista y antagonista. El efecto agonista se presenta cuando los péptidos se unen a los receptores en el lumen intestinal y actúan como moduladores exógenos de la motilidad gastrointestinal.

Concretamente las β -casomorfina son capaces de crear el efecto antagonista, a través de la reducción de la secreción gástrica y la permeabilidad intestinal. Actualmente existe un gran interés por su posible papel benéfico en el tratamiento de la diarrea. Las casomorfina podrían de esta manera ejercer un efecto local, sin necesidad de adsorción sistémica al reducir el reflejo peristáltico mediante la disminución de la respuesta refleja. Esto lleva a pensar en un posible rol terapéutico en el tratamiento de desordenes gástricos (Meisel *et al.*, 1997). Estos péptidos (derivados de la α y β -caseína), pueden producir analgesia, modulan la conducta social e influyen en la estimulación de la secreción de insulina y somatostatina (Meisel *et al.*, 1997).

Las exorfinas son péptidos derivados de la α_{s1} -caseína, tienen propiedades farmacológicas similares al opio, las lactofinas (derivadas de la α -lactoalbúmina), actúan como opioides agonistas, mientras que las casoxinas (derivadas de la κ -caseína), se comportan como opioides antagonistas.

2.5.2 PÉPTIDOS INMUNOESTIMULADORES

Recientes investigaciones han demostrado que la actividad metabólica de las bacterias lácticas en la leche, generan péptidos inmunoestimuladores a través de la vía enzimática, estos péptidos producen una respuesta mayor del sistema inmune a través de un aumento de la actividad fagocítica de los leucocitos (Harsharnjit *et al.*, 2000).

Los inmunopéptidos obtenidos de α_{s1} , β -caseína y α -lactoalbúmina estimulan la actividad fagocítica de las células, al proteger al organismo contra *Klebsiella pneumoniae*. La isracidina, péptido originado de la hidrólisis de la α_{s1} -caseína, ofrece protección contra *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*; también se observó que favorece una mayor formación de anticuerpos y proliferación de linfocitos (Harsharnjit *et al.*, 2000).

Tabla 4. Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche (Meisel, 2001).

Nombre	Proteína precursora	Fragmento	Secuencia del péptido	Bioactividad
β - Casomorfina-11	β - caseína	(60-70)	YPFPGPIPNSL	Opioide
β - Casomorfina-7	β - caseína	(60-66)	YPYPGPI	Opioide, inhibidor de ACE, inmunomodulador.
Exorfina de α - caseína	α_{s1} - caseína	(90-96)	RYLGYLE	Opioide agonista
α - lactorfina	α -lactoalbúmina	(50-53)	YGLF	Opioide, inhibidor de ACE
β -lactorfina	β -lactoglobulina	(102-105)	YLLF	Opioide, inhibidor de ACE
Serorfina	seroalbúmina	(399-304)	YGFQNA	Opioide
Casoxina 6	κ - caseína	(33-38)	SRYPSSY X OCH ₃	Opioide antagonista
Casoxina C	κ - caseína	(25-34)	YIPIQYVLSR	Opioide antagonista
Lactoquinina	β -lactoglobulina	(102-103)	YI	Inhibidor de ACE
Lactoquinina	β -lactoglobulina	(142-148)	ALPMHIR	Inhibidor de ACE
Seroquinina	seroalbúmina	(208-216)	ALKAWSVAR	Inhibidor de ACE
β -casoquinina	β -caseína	(84-86)	VPP	Inhibidor de ACE
β -casoquinina	β -caseína	(177-183)	AVPYPQR	Inhibidor de ACE
α_{s1} - casoquinina	α_{s1} -caseína	(23-24)		Inhibidor de ACE
α_{s1} - casoquinina	α_{s1} -caseína	(25-27)	VAP	Inhibidor de ACE
α_{s1} - casoquinina	α_{s1} -caseína	(142-147)	LAYFYP	Inhibidor de ACE
β -casoquinina	β -caseína	(193-202)	YQQPVLGPVR	Inhibidor de ACE e inmunoestimulador
Casoplatelina	κ - caseína	(106-116)	MAIPPKKNQDK	antitrombótico
Caseinofosfopéptido	β -caseína	(1-25)	RELEELNVPGEI VESLSSSEESIT R	Acarreador de minerales e inmunomodulador
Caseinofosfopéptido	α_{s1} -caseína	(43-58)	DIGSESTEDQA MEDIM	Acarreador de minerales
Caseinofosfopéptido	α_{s1} -caseína	(66-73)	SSSEEIVPN	Acarreador de minerales
Caseinofosfopéptido	β -caseína	(7-18)	NVPGEIVESLSS	Acarreador de minerales
Caseinofosfopéptido	β -caseína	(29-41)	KIEKFQSEEQQ QT	Acarreador de minerales
α_{s1} -inmucasoquinina	α_{s1} -caseína	(194-199)	TTMPLW	Inhibidor de ACE, inmunomodulador.
Inmunopéptido	β -caseína	(63-68)	PGPIP	Inmunomodulador.
Inmunopéptido	β -caseína	(191-193)	LLY	Inmunomodulador.
Lactoferrina	lactoferrina	(17-41)	FKCRRWQWRM QLGAPSITCVR RAF	Antimicrobiano e inmunomodulador

2.5.3 PÉPTIDOS ACARREADORES DE MINERALES

La estructura de la caseína presenta varios residuos fosfato y fosfopéptidos. En el intestino, estos fosfopéptidos forman compuestos solubles con el calcio, por lo que favorecen una mejor absorción del calcio. Los caseinofosfopéptidos pueden inhibir la caries dental a través de la recalcificación del esmalte dental, razón por la cual se ha sugerido su aplicación en el tratamiento de enfermedades dentales (Swaisgood y Clare, 2000).

Los fosfopéptidos derivados de la caseína, forman sales organofosfatadas con trazas de elementos como Fe, Mn, Cu y Se, para funcionar como acarreadores, por lo que han sido utilizados en el tratamiento de raquitismo (Smacchi y Gobetti, 2000).

Los fosfopéptidos derivados de la hidrólisis de caseína mejoran la calcificación de los huesos en ausencia de Vitamina D, además los caseinofosfopéptidos juegan un papel importante en el transporte de calcio durante la absorción en la mucosa del duodeno, así como la absorción en las microvellosidades del intestino (Kitts y Yuan, 1992).

2.5.4 PÉPTIDOS ANTITROMBÓTICOS

Son péptidos generados de la κ -caseína. La casoplatelina, afecta la formación e inhibe la agregación de plaquetas activadoras de ADP y las ligadas al fibrinógeno humano. Al hidrolizar las proteínas de la leche con tripsina se obtuvo un fragmento de κ -caseína, la casiopiastrina que posee actividad antitrombótica, a través de la inhibición de la unión del fibrinógeno.

Se han observado péptidos antitrombóticos en el plasma de infantes después de la ingesta de leche materna y de fórmula láctea. Los péptidos obtenidos de la digestión intestinal pueden producir efectos locales sobre la región gastrointestinal en la mucosa absorbente o bien pueden entrar al torrente sanguíneo para alcanzar los órganos vecinos (Meisel y Schlimme, 1990).

2.5.5 PÉPTIDOS BACTERICIDAS

Son péptidos que tienen la capacidad de inhibir microorganismos patógenos por un incremento de la permeabilidad de la membrana celular.

Dionysius y Milne (1998), observaron la actividad bactericida de la lactoferrina (péptidos generados del fragmento 17-41 de la lactoferrina), en cepas de *E. coli* enterotoxigénica y en *Listeria monocitogenes*. Posteriormente se observó la actividad bactericida en cepas aisladas de *E. coli* enterohemorrágica. Las propiedades antifúngicas de la lactoferrina se demostraron con *Candida albicans*.

La casocidina I (residuos 165-203), fragmento de la α -_{s2} caseína, contiene una alta proporción de residuos de aminoácidos básicos que inhiben el crecimiento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus carnosus*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* (Meisel, 2001; Meisel et al., 1997).

Se han encontrado péptidos bactericidas en leche, glicopéptidos básicos con actividad bactericida contra cadenas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus*

La isracidina, segmento de α -_{s1} caseína protege contra *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* en ratones; este péptido previene a las ovejas y vacas de la mastitis. El glicopéptido derivado de la fracción (106-169) de la κ -caseína actúa como péptido de defensa por su capacidad de inhibir adhesiones virales y bacterianas en las superficies de la boca (Brody, 2000).

2.5.6 PÉPTIDOS ANTIHIPERTENSIVOS (INHIBIDORES DE ACE)

La enzima convertidora de angiotensina I (ACE) se encuentra localizada en diferentes tejidos y es una enzima clave en la regulación de la presión sanguínea. Esta enzima ha estado asociada al sistema renina-angiotensina. Dicho sistema interviene en la regulación de la presión sanguínea y en la regulación del metabolismo de electrolitos; cuando la enzima angiotensina I es inhibida, se obtiene un efecto antihipertensivo (Meisel, 1993).

Los péptidos inhibidores de ACE derivados de la leche, son diferentes fragmentos de caseínas, llamados casoquininas y los péptidos generados por las proteínas del suero son llamadas lactoquininas. Las casoquininas, altamente activas, son fragmentos de la α_{s1} -caseína (23-27) y de la β -caseína (177-183) tienen un IC_{50} menor de 20 μ M (IC_{50} : concentración de péptido que inhibe la actividad de ACE en un 50%). El fragmento opioide de la β -casomorfina, exhibe una baja actividad inhibidora de ACE, mientras que la β -lactorfina presenta una actividad moderada. Gobetti *et al.*, 2000, elaboraron una leche fermentada con *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* y *Lactococcus lactis ssp cremoris* FT4 y encontraron un péptido inhibidor de la angiotensina, proveniente de la β -caseína f47-52.

2.6 PÉPTIDOS BIOACTIVOS EN LECHE Y LECHE FERMENTADAS

El tipo de cultivo empleado es uno de los principales factores que influyen en el tipo de péptidos bioactivos encontrados en leches fermentadas. Se ha observado que la proteólisis por *Lactobacillus helveticus* está relacionada con la producción de péptidos antihipertensivos. Nakamura *et al.*, (1995), purificaron péptidos inhibidores de ACE de una bebida japonesa fermentada con *Lb helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Los péptidos antihipertensivos, Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro, los cuales son originados por hidrólisis de la α_{s1} - y β -caseína. Estos péptidos también han sido encontrados en otras leches fermentadas producidas por *Lb helveticus* CP790 (Meisel, 1998).

Los péptidos inhibidores de ACE, no son tan potentes como los medicamentos usados en el tratamiento de la hipertensión. Los productos lácteos tienen actividad moderada y pueden ser considerados como alimentos funcionales y deben ser incluidos en la dieta diaria (Meisel *et al.*, 1997).

Una leche fermentada con *Lactobacillus GG* y posteriormente hidrolizada con pepsina y tripsina, presentó péptidos bioactivos que corresponden a fragmentos de la α_{s1} -, la β -caseína y la α -lactoalbúmina, con actividad inmunomoduladora, opioide y

actividad inhibitoria de ACE, respectivamente. La producción de estos péptidos bioactivos podrían explicar parcialmente las propiedades probióticas atribuidas al *Lactobacillus GG* (Rokka *et al.*, 1997).

Belem *et al.*, (1999), utilizaron la levadura *Kluyveromyces marxianus var. marxianus* en la fermentación de suero de leche y encontraron 2 péptidos con propiedades antihipertensivas.

En el yogurt se han encontrado péptidos que reducen el riesgo de cáncer de colon, por medio de una disminución de la proliferación de células cancerosas (Rowland, 2002; Ganjam *et al.*, 1997).

3. MÉTODOLÓGÍA

3.1 PROTEÍNAS.

Las proteínas utilizadas como sustrato en este estudio fueron: caseína Hammarsten (Research Organics), seroalbúmina (Sigma), lactoferrina (Sigma) y WPC 80 (Hilmar Cheese Company).

3.2 AISLAMIENTO DE *S. thermophilus* de LC1

Se realizó el aislamiento del microorganismo de interés a partir del producto comercial LC1. Se utilizó la técnica de siembra por estría cruzada en medio selectivo M17 (Difco). El cual es selectivo para *Streptococcus*, es un medio rico y por efecto del β -glicerofosfato sódico (componente de este medio), aumenta la capacidad tampón del medio lo que favorece el crecimiento de estos microorganismos. Se incubó a la temperatura óptima del microorganismo (42°C) y se utilizó el sistema de anaerobiosis (Gaspak).

- LC1: elaborado por Nestlé de México, S.A. de C.V., producido con *L. johnsonii* y *Streptococcus thermophilus*.

Al utilizar el medio selectivo M17, se pudo separar al *S. thermophilus* del *L. johnsonii*, ambos presentes en el producto comercial. Una vez aisladas las colonias de *S. thermophilus*, se realizaron tinciones de Gram y se observaron en el microscopio óptico (Olimpus BX 50), una vez identificadas las colonias de interés, se conservaron en Litmus milk (Difco) a 4°C.

3.3 CARACTERIZACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO.

El medio MRS (Difco), se inoculó al 1% con *Streptococcus thermophilus*, se monitoreó el crecimiento midiendo $DO_{650\text{ nm}}$, se realizó el muestreo cada hora, durante 10 horas. Los experimentos se realizaron por duplicado y se utilizó como blanco el medio de cultivo sin inóculo. La finalidad de caracterizar la curva de

crecimiento de *S. thermophilus* fue para conocer las diferentes etapas de crecimiento y poder colectar las células en fase exponencial, ya que se ha reportado que en esta etapa la actividad proteolítica es mayor.

A partir de esta fermentación se hizo una curva de crecimiento de *S. thermophilus*, para relacionar el peso seco de las células con la densidad óptica a 650 nm. De esta forma se pudo mantener constante el número de células colectadas, el procedimiento se describe en el apéndice 1.

3.4 PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS PARA EL SISTEMA DE RESTING CELLS

La cepa almacenada en Litmus milk, se inoculó al 1% en leche y se incubó por 12 horas a 42°C.

Posteriormente se tomó 1 ml de la leche con las células y se inoculó en caldo MRS, se incubó por alrededor de 5 h, hasta que la densidad óptica a 650 nm fuera de 2.6 UA (unidades de absorbancia).

Una vez colectadas las células y con el fin de eliminar algún residuo del caldo MRS, se centrifugaron a 8000 rpm en una centrifuga Beckman (J2-MI) a 4°C, por 10 minutos y se lavaron las células dos veces con solución salina 0.85%, finalmente se resuspendieron en 20 ml de solución al pH correspondiente.

Se realizó la prueba de viabilidad, esto con la finalidad de conocer si las células para el sistema de biotransformación, eran viables. A partir de la solución de células resuspendidas, se realizaron siembras por estría cruzada en agar MRS y se incubaron a 42°C en jarra de anaerobiosis utilizando el sistema de anaerobiosis (Gaspak). Se realizó la cuenta viable, para demostrar que las células se encontraban en condiciones para ser utilizadas en el sistema.

3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó un diseño experimental rotatorio para obtener información del efecto de dos factores simultáneamente (pH y concentración de calcio); sobre la velocidad de generación de péptidos. Se realizó un diseño 2^2 , con un punto central (con tres repeticiones) y cuatro puntos axiales. Los dos factores estudiados fueron el pH y la concentración de CaCl_2 con 2 niveles para cada variable, pH (6.5, 7 y 7.5), CaCl_2 (2, 4 y 6 mM). El sistema utilizado fue de resting cells (células en reposo). La variable respuesta fue la velocidad de generación de péptidos (V_o).

Se prepararon 20 ml de una solución de proteína al 2%, en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, con la concentración de calcio correspondiente. A la solución de proteína y CaCl_2 , se agregaron las células resuspendidas (sección 3.4), en la solución a pH correspondiente el número de células total fue de 2.170 mg células/ml. El volumen final de reacción fue de 40 ml y la concentración de proteína del 1%.

El blanco utilizado en la reacción se preparó con la solución de proteína y CaCl_2 , no se utilizaron células.

La reacción enzimática se realizó por 120 minutos en condiciones controladas de temperatura a 37°C y una agitación constante de 50 rpm.

A las muestras se les agregó el mismo volumen de solución de ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Las muestras se centrifugaron a 18000 rpm en una centrífuga Beckman J2-MI por 30 minutos, esto con el fin de eliminar proteína de alto peso molecular. Posteriormente se determinaron los péptidos solubles por el método de Lowry (sección 3.6).

3.6 DETERMINACIÓN DE PÉPTIDOS SOLUBLES.

La determinación de péptidos solubles en el sobrenadante obtenido después de la precipitación de proteínas de alto peso molecular con TCA (sección 3.5 y 3.7), se realizó por el método de Lowry, (Lowry *et al.*, 1951). Este método consta de dos

etapas: en la primera, los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen al péptido y forma complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos tienen un color azul claro; se exponen los residuos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina al formar un complejo con el tartrato de sodio y potasio.

En la segunda etapa, el cobre actúa como catalizador de la reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por parte de los grupos fenólicos de los residuos de tirosina. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los fenoles da lugar a un complejo de color azul intenso (García y Duhalt, 1998). La preparación de los reactivos se describe en el apéndice 2.

La concentración de péptidos se determinó por interpolación de las absorbancias contra una curva patrón para cada proteína (caseína, seroalbúmina, lactoferrina y WPC80), con un intervalo de 0-100 $\mu\text{g/ml}$ (apéndice 2)

3.7 SISTEMA Y CONDICIONES DE REACCIÓN ENZIMÁTICA PARA MEDIR EL EFECTO DEL SUSTRATO Y pH.

Se estudió la actividad enzimática del microorganismo con un sistema de resting cells (células en reposo), con diferentes proteínas (sección 3.1), a pH 5.5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11.

Se prepararon 20 ml de una solución de proteína al 2% al pH correspondiente. A la solución de proteína se le agregaron las células resuspendidas en la solución a pH correspondiente (sección 3.4). El volumen final fue de 40 ml, la concentración de células fue de 2.170 mg de células /ml y la concentración de proteína del 1%. El blanco utilizado en la reacción se preparó con la solución de proteína, no se utilizaron células.

La reacción enzimática se realizó en condiciones controladas de temperatura a 37°C y una agitación constante de 50 rpm. Se tomaron muestras de 1 ml cada 15 minutos, durante 1 hora.

A las muestras se les agregó el mismo volumen de solución de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, en el caso de caseína y seroalbúmina, para el WPC 80 y lactoferrina se usó TCA al 24% (Afnor, 1986). Las muestras se centrifugaron a 18000 rpm en una centrífuga Beckman J2-MI por 30 minutos, esto con el fin de eliminar proteína de alto peso molecular. Posteriormente se determinaron los péptidos solubles por el método de Lowry (sección 3.6).

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el programa NCSS 2000. Para la comparación entre las velocidades de generación de péptidos a los diferentes valores de pH, se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Se realizó un análisis de varianza de las velocidades de generación de péptidos (V_0), entre los diferentes valores de pH y los sustratos utilizados.

Tanto en el **ANOVA** como en la prueba de Tukey, el nivel de significancia utilizado fue de 0.05.

3.9 ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Se utilizó la técnica descrita por Shahabal *et al.*, (1993), con la unidad de electroforesis vertical (Miniprotean III de Bio-Rad). Se utilizó un gel de separación de 14% de acrilamida y el gel concentración de 5% (apéndice 4b).

3.9.1 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE PROTEÍNAS HIDROLIZADAS

Se tomó 1 ml de las muestras (sección 3.7) y se centrifugaron a 18000 rpm en una centrífuga Beckman J2-MI, por 15 min, para eliminar las células presentes. Se tomaron 40 μ l de la muestra y se agregaron 20 μ l de buffer de corrida con β -

mercaptoetanol, se incubaron 5 min en agua en ebullición. Se inyectaron 10 µl de las muestras en cada carril del gel. La electroforesis corrió a 30mA por 90 min. Posteriormente los geles fueron teñidos en una solución de azul de Coomasie. Se enjuagaron los geles y se tomó la imagen en Gel Doc 100 de Bio-Rad.

3.9.2 DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR

Los pesos moleculares de las bandas del gel de electroforesis se estimaron al utilizar como referencia el patrón de rango amplio (Bio-Rad) (Tabla 5).

Se calculó el Rf de las bandas de cada una de las proteínas de dicho patrón, con esta información, se generó una curva patrón al graficar el Rf contra el log del Peso molecular y se obtuvo la siguiente ecuación:

$$Y = -1.3472x + 5.1683, R^2 = 0,9664$$

Donde:

Y= peso molecular

X= Rf

Tabla 5. Pesos moleculares de proteínas del patrón de rango amplio (Bio-Rad).

PROTEÍNA	PESO MOLECULAR (DA)
Miosina	200,000
β - galactosidasa	116,500
Fosforilasa b	97,400
Seroalbúmina	66,200
Ovoalbúmina	45,000
Anhidrasa Carbónica	31,000
Inhibidor de Tripsina	21,500
Lisozima	14,400
Aprotinina	6,500

3.9.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

Se utilizó el analizador de imágenes Gel Doc (Biorad), para determinar la concentración de proteína en el gel de electroforesis. A partir del tiempo cero, se tomo como la concentración inicial de proteína, a partir de ese valor, se determinó la concentración para cada tiempo de hidrólisis.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 AISLAMIENTO DE *S. thermophilus* DE LC1 Y CARACTERIZACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO.

Se aisló *S. thermophilus* de LC1, de acuerdo a la metodología descrita en la sección 3.2. Se usó el medio selectivo M17 (Difco). La observación de una muestra preparada con la tinción de Gram, demostró la presencia de cocos en pares y en cadena (Figura 1). Estas observaciones confirmaron el aislamiento de *S. thermophilus* a partir de la leche fermentada comercial LC1. Los resultados obtenidos, coinciden con lo reportado con el productor (Nestlé) y con los estudios de Holzapfel *et al.*, (1998) y Reuter (1997), quienes realizaron un estudio de esta leche fermentada comercial y reportaron la presencia de *S. thermophilus*.



Figura 1. Micrografía de una muestra con tinción de Gram del *S. thermophilus*, en microscopio óptico (100x).

Una vez aislado el *S. thermophilus* se realizó una cinética de crecimiento (Figura 2), con el objeto de definir las diferentes etapas de desarrollo de este microorganismo.

A partir de la información obtenida en la Figura 2, se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (t_d) (apéndice 3). La velocidad específica de crecimiento de *S. thermophilus* fue de 0.67 h^{-1} , mientras que el tiempo de duplicación, fue de 1 hora.

En la Figura 2, se observa que la fase lag duró 2 horas, a partir de este momento hasta la 6ª hora, se presentó la fase exponencial de crecimiento. Cabe señalar la importancia de conocer con exactitud a partir de que hora comienza la fase de crecimiento exponencial, ya que se ha reportado que es en esta etapa en la que se da la mayor actividad proteolítica de estos microorganismos (Shahbal *et al.*, 1993).

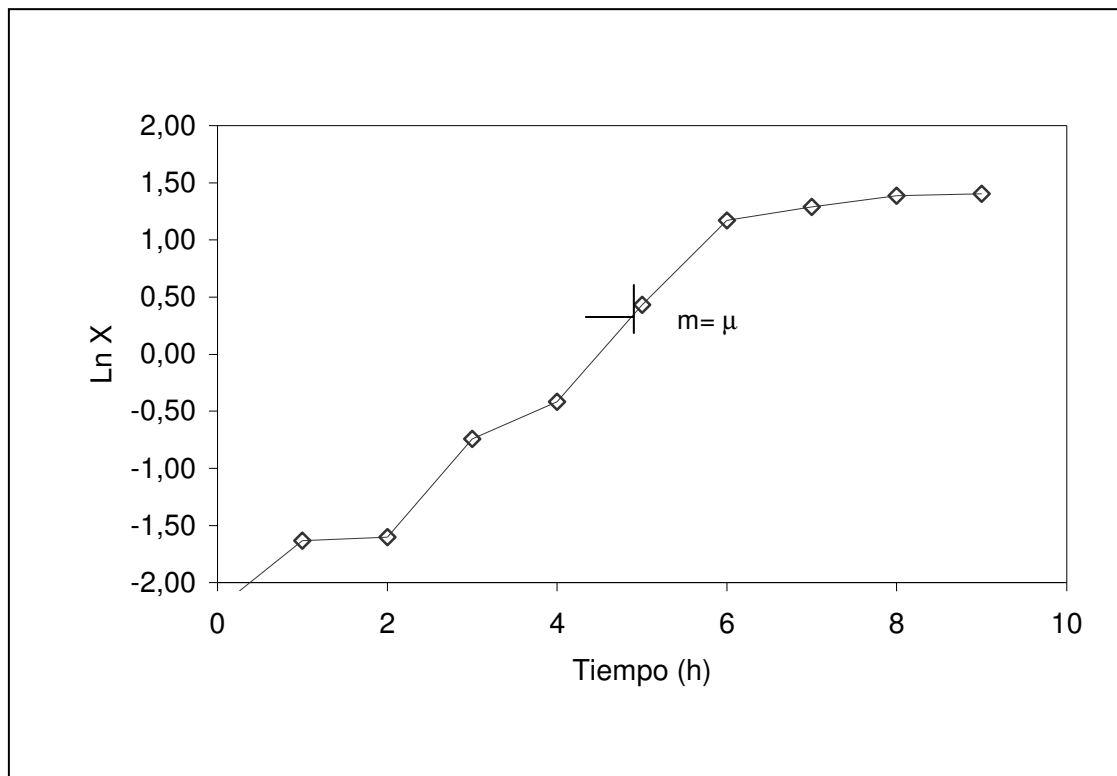


Figura 2. Cinética de crecimiento de *S. thermophilus* de LC1 en Caldo MRS a 42°C.

4.2 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CaCl_2 Y pH EN LA GENERACIÓN DE PEPTIDOS POR *S. thermophilus*

Una vez caracterizada la fase de crecimiento exponencial, se evaluó el efecto del ion calcio y del pH en la generación de péptidos por *S. thermophilus*. Se ha reportado que el efecto de este ión y la variación del pH, pueden afectar positivamente la actividad de las enzimas proteolíticas. Fernandez-Espla *et al.*, 2000; reportan un incremento de la actividad enzimática de 2-10 veces cuando se utiliza CaCl_2 a una concentración de 2- 10 mM, respectivamente. Por otro lado Shahbal *et al.*, 1993; reportan que la actividad de las fracciones celulares aumenta hasta 6 veces, cuando se utiliza Ca^{2+} en una concentración de 5 mM.

Las condiciones bajo las cuales se realizaron estos experimentos se muestran en la sección 3.5.

Se aplicó un modelo experimental con la finalidad de obtener el máximo de resultados con un mínimo número de experimentos. Este modelo nos permitió estudiar de manera simultánea el efecto de la concentración de CaCl_2 y el pH sobre la velocidad de generación de péptidos (V_0) de *S. thermophilus* de LC1.

Se utilizó el diseño central compuesto circunscrito del tipo 2^2 con un punto central con tres repeticiones y con cuatro puntos axiales. Los valores reales y los valores codificados del diseño experimental se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Valores codificados y reales del diseño experimental.

Ensayo	Codificados		Reales		Variable Respuesta
	X1	X2	pH	Concentración de CaCl ₂ (mM)	Vo (mg/ml min))
1	+1	+1	7.5	6	4 x 10 ^{-4 a}
2	-1	-1	6.5	2	1 x 10 ^{-4 b}
3	+1	-1	7.5	2	4 x 10 ^{-4 a}
4	-1	+1	6.5	6	4 x 10 ^{-4 a}
5	0	0	7	4	4 x 10 ^{-4 a}
6	0	0	7	4	4 x 10 ^{-4 a}
7	0	0	7	4	4 x 10 ^{-4 a}
8	+1.68	0	7.84	4	4.7 x 10 ^{-4 c}
9	-1.68	0	6.16	4	2 x 10 ^{-4 d}
10	0	+1.68	7	7.36	3.3 x 10 ^{-4 e}
11	0	-1.68	7	0.68	4.1 x 10 ^{-4 a}

Se aplicó un polinomio de segundo grado con interacciones que permitió la estimación del efecto de la concentración de CaCl₂ y el pH en la generación de péptidos solubles en un tiempo de reacción de 120 min. El efecto de la velocidad de estas variables se representó por el polinomio de segundo orden:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_1X_2 + b_4X_1^2 + b_5X_2^2 \quad (\text{ecuación 1})$$

Donde Y es la variable respuesta (Vo), que es la velocidad de generación de péptidos, calculada a partir de la pendiente de la curva de los valores de producción de péptidos en el tiempo de reacción (0-120 minutos). X1 y X2 son las variables codificadas de concentración de CaCl₂ y pH, respectivamente (variables

experimentales) y de b_0 a b_5 son los coeficientes estimados de las variables y sus interacciones (Tabla 7).

Se realizaron once experimentos en total. Las curvas obtenidas a partir de la generación de péptidos solubles por hidrólisis de caseína al 1%, se muestran en la Figura 3.

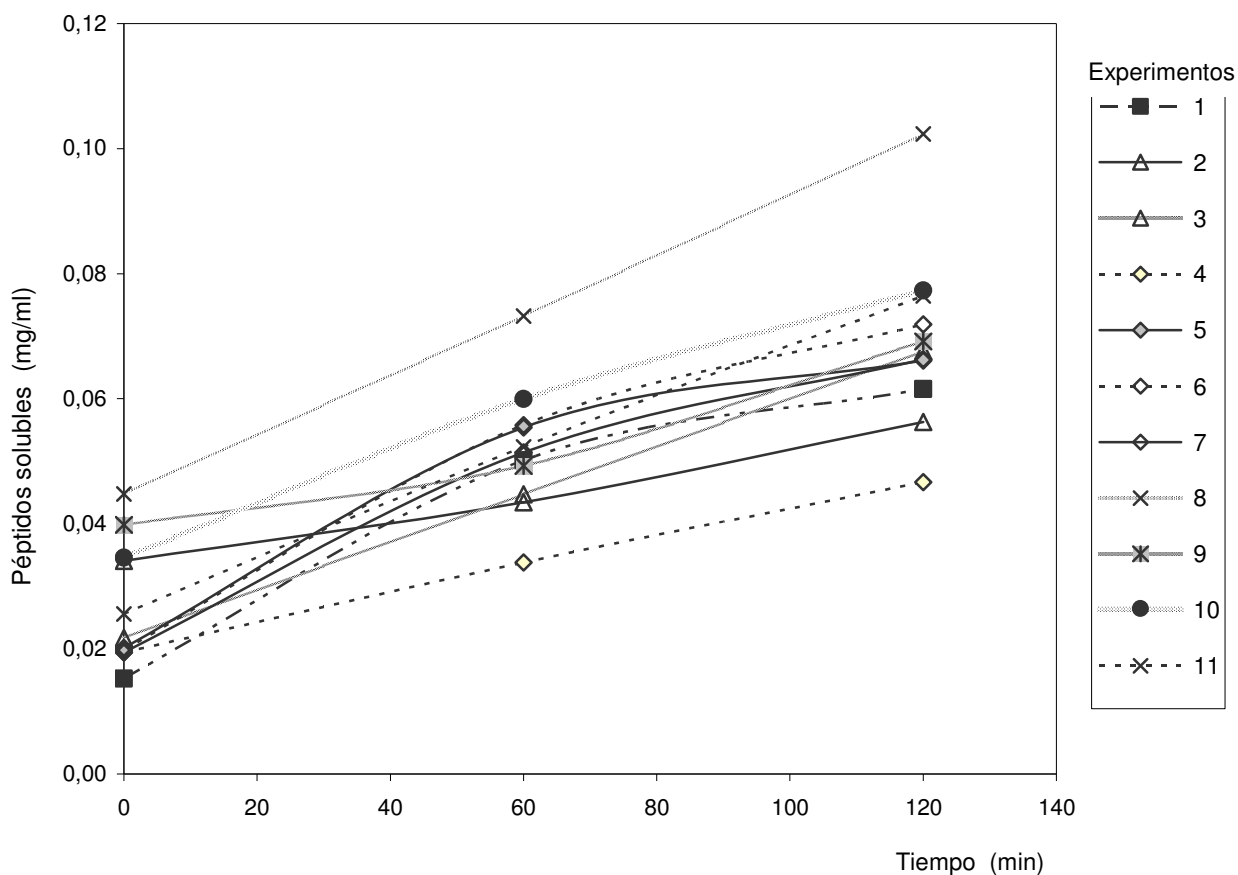


Figura 3. Producción de péptidos a partir de caseína 1% por *S. thermophilus* aislado de LC1. Efecto de la concentración de pH y CaCl_2 .

A partir de estas curvas (Figura 3), se calculó la velocidad de generación de péptidos para cada experimento. Los valores de V_0 , se muestran en la Tabla 6.

En los experimentos 5, 6, 7, 10 y 11 en donde el pH se mantiene constante, se observa que existe una diferencia en la velocidad de generación de péptidos, ya que

al disminuir la concentración de CaCl_2 (0.68 mM), la velocidad de generación de péptidos aumenta (4.1×10^{-4} mg/ml min), cuando la concentración de CaCl_2 aumenta (7.36 mM), la velocidad de generación de péptidos disminuye (3.3×10^{-4} mg/ml min).

Al comparar los experimentos 5, 6, 7, 8 y 9 se observa que la velocidad de generación de péptidos es mayor a medida que el pH aumenta, ya que a pH 7.84, la velocidad de generación de péptidos es mayor (4.7×10^{-4} mg/ml min), lo que indica que el pH tiene un efecto activador sobre la velocidad de generación de péptidos (V_o) de *S. thermophilus* por sí sólo y no la concentración de CaCl_2 .

Tabla 7. Coeficientes estimados del polinomio (ecuación 1), de b_0 a b_5 son los coeficientes estimados a partir de las variables y sus interacciones.

Parámetro	Valor
b_0	$- 7.42 \times 10^{-3}$
b_1 (pH)	1.92×10^{-3}
b_2 (Concentración de CaCl_2)	$+ 1.96 \times 10^{-4}$
b_3 (pH Concentración de CaCl_2)	$- 2.5 \times 10^{-5}$
b_4 (pH ²)	$- 1.15 \times 10^{-4}$
b_5 (Concentración de CaCl_2^2)	$- 3.12 \times 10^{-6}$
R^2	0.770

A partir de los resultados obtenidos del diseño experimental, se generó la superficie de respuesta (Figura 4). De esta manera es posible apreciar que tan cerca se encuentra nuestro dominio experimental del óptimo. La gráfica de contornos se realizó a partir del modelo de predicción de V_o , con el fin de tener una mejor apreciación de la influencia de las variables independientes (pH y concentración de CaCl_2) sobre la variable respuesta (V_o).

En las Figuras 4 y 5 se observa que la variación del pH tiene un efecto mayor en la variable respuesta (V_o), a diferencia de la concentración de CaCl_2 la cual ejerce un

efecto menor. Conforme aumenta el pH aumenta la velocidad de generación de péptidos (V_0).

Los resultados encontrados en este trabajo donde se obtuvo la máxima velocidad de generación de péptidos (4.7×10^{-4} mg/ml min) a pH de 7.84 y concentración de CaCl_2 de 4 mM, contrastan con los reportados en la literatura. Shahbal *et al.*, (1993), ya que ellos reportaron un incremento de la actividad proteolítica hasta cinco veces de los extractos de la pared celular de *S. thermophilus* CNRZ 385 y *S. thermophilus* CNRZ 703 cuando se utilizan concentraciones (5mM) de este ión a pH 7 en ambas cepas; cuando utilizó caseína como sustrato.

Fernandez-Espla *et al.*, (2000), reportaron que la actividad proteolítica de la proteasa aislada de *S. thermophilus* CNRZ 385 aumenta de 2 a 10 veces después de la adición de CaCl_2 a una concentración de 2 a 10 mM, cuando utilizaron Ac-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa como sustrato.

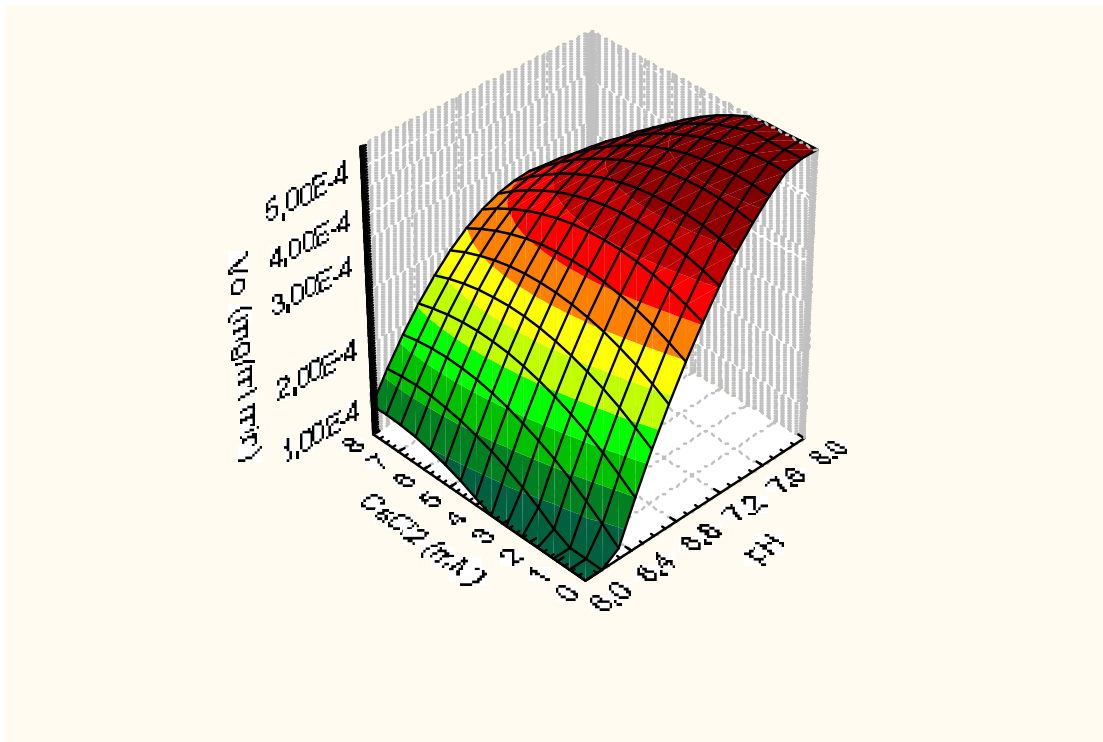


Figura 4. Superficie de respuesta del efecto de la concentración de CaCl_2 y pH en la generación de péptidos por *S. thermophilus* aislado de LC1 en solución de caseína al 1%.

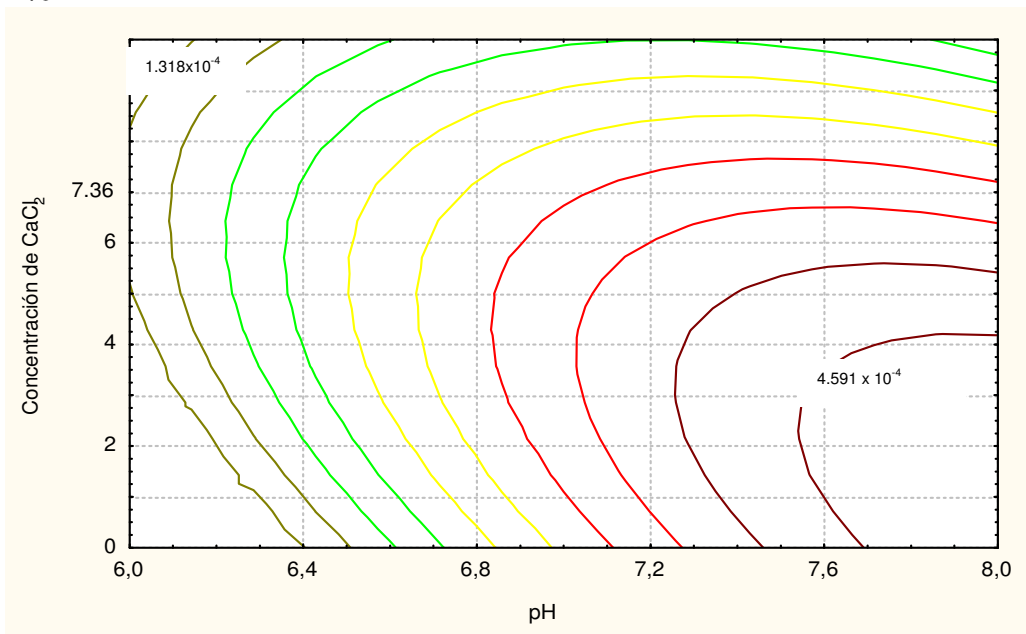


Figura 5. Gráfica de contornos del efecto del CaCl_2 y pH en la generación de péptidos por *S. thermophilus* aislado de LC1 en solución de caseína al 1%.

Letort y Juillard (2001), encontraron un efecto estimulador del ión calcio, en el crecimiento de diferentes cepas de *S. thermophilus*, al suprimir este ión, en los medios experimentales de crecimiento, se encontró una reducción hasta en un 46.8% de la población de las cepas estudiadas. Este crecimiento se encuentra indirectamente relacionado con la generación de péptidos por el sistema proteolítico del microorganismo, ya que estos péptidos son generados por el microorganismo para su crecimiento (Tamime y Robinson, 1991).

En este estudio, bajo las condiciones de trabajo, se encontró que las concentraciones utilizadas de CaCl_2 no tienen gran influencia en la generación de péptidos por *S. thermophilus* aislado de LC1.

Otro factor que interviene en la diferencia de resultados obtenidos en este trabajo con los reportados por otros autores es que el tiempo de reacción fue menor. Shahbal *et al.*, (1993), probaron tiempos de reacción de hasta 24 h y encontraron que alrededor de las cuatro horas se tenía una mejor hidrólisis hasta la hidrólisis total de la caseína a las 24 h.

Es importante considerar que los sistemas experimentales reportados (Shahbal *et al.*, 1993; Fernandez-Espla *et al.*, 2000), son diferentes al sistema utilizado en este estudio, ya que no se trabajó con extractos de pared celular, donde se reporta alrededor del 41% de la actividad proteolítica en la fracción de la pared celular, o con una enzima aislada, la cual presenta preferencia por aminoácidos aromáticos.

En cuanto al pH, el sistema enzimático de *S. thermophilus* aislado de LC1, presentó un comportamiento similar a los estudios previos, ya que Shahbal *et al.*, (1993), reportaron de la pared celular una actividad máxima a pH de 7, cuando se utilizaron células rotas. Fernandez-Espla *et al.*, (2000), encontraron una actividad máxima a pH de 7.5 cuando se utilizó la enzima aislada. En este estudio, la actividad máxima con caseína como sustrato fue a pH de 8.

El planteamiento del diseño experimental sirvió para establecer las mejores condiciones (pH 7.84), para estudiar la generación de péptidos en nuestro sistema de estudio. Se encontró que el pH por sí solo, es un factor con mayor influencia en la velocidad de la generación de péptidos (V_o), y no la concentración de CaCl_2 cuando se utilizó una solución de caseína al 1%.

4.3 EFECTO DEL SUSTRATO Y EL pH EN LA VELOCIDAD DE GENERACIÓN DE PÉPTIDOS POR *S. thermophilus*

De acuerdo a los resultados obtenidos por el diseño experimental (sección 4.2), se realizaron experimentos con diferentes proteínas (caseína, seroalbúmina, lactoferrina y WPC 80) a diferentes valores de pH (5.5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11) como se describe en la sección 3.7.

4.3.1 SUSTRATO: CASEÍNA

Se calculó la pendiente para cada valor de pH de las curvas de la Figura 6, de esta manera, se obtuvieron las velocidades de generación de péptidos (V_o) a partir de caseína (Tabla 8).

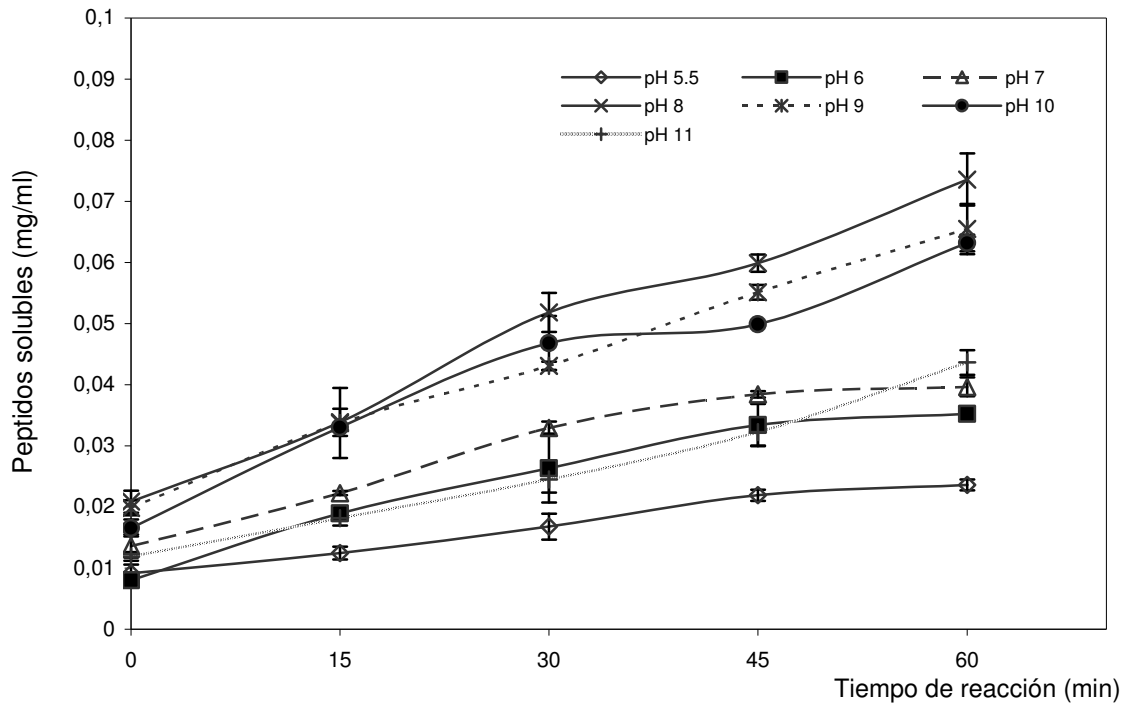


Figura 6. Generación de péptidos por *S. thermophilus* aislado de LC1 a partir de caseína al 1% a 37°C a diferentes valores de pH.

Tabla 8. Velocidades de generación de péptidos (V_o) por *S. thermophilus* a partir de caseína a diferentes valores de pH.

pH	V_o (mg/ml min)
5.5	$2.56 \times 10^{-4} \text{ a}$
6	$4.59 \times 10^{-4} \text{ b}$
7	$4.55 \times 10^{-4} \text{ b}$
8	$8.76 \times 10^{-4} \text{ c}$
9	$7.51 \times 10^{-3} \text{ c}$
10	$7.35 \times 10^{-4} \text{ c}$
11	$5.17 \times 10^{-4} \text{ b}$

La prueba de Tukey-Kramer de comparaciones múltiples, la cual fue utilizada para comparar las velocidades de generación de péptidos, (V_o), muestra que existen diferencias significativas (α 0.05), entre los diferentes valores de pH (Tabla 8). A pesar de estas diferencias, se encontró la mayor velocidad a pH de 8

La mayor velocidad de generación de péptidos (8.76×10^{-4} mg/ml min) con caseína a pH 8. La degradación de las proteínas se encuentra relacionada con la especificidad de las enzimas y con las propiedades intrínsecas del sustrato, en este caso, la caseína, ya que en solución, esta proteína presenta una estructura no compacta y flexible con alta proporción de residuos disponibles en el medio (Kunji *et al.*, 1996).

Es importante señalar que el sustrato utilizado para estos experimentos es una proteína que ha sufrido tratamiento previo y es una combinación de diferentes

caseínas de leche de vaca, estas proteínas presentan diferentes estructuras y propiedades en su forma natural. La caseína α_{s1} posee una estructura secundaria abierta para permitir fácilmente la entrada de las proteasas a la molécula, además estudios bioquímicos, indican claramente que esta proteína no se comporta como proteína globular; esto se debe sin duda a la importancia de los grupos ácidos, fuertemente solvatados, que confieren a la molécula su comportamiento de proteína naturalmente desnaturalizada, lo que la hace susceptible a la hidrólisis (Cheftel *et al.*, 1989). Esta proteína también tiene la capacidad de formar dímeros, tetrámeros, hexámeros, etc, el grado de asociación se encuentra fuertemente dependiente del pH y fuerza iónica (Fox, 1992).

En el caso de la caseína α_{s2} , esta proteína posee una estructura hidrofílica, lo que sugiere que las interacciones electrostáticas son muy importantes y dependen del pH (Cheftel *et al.*, 1989).

La β -caseína al ser una proteína hidrofóbica, presenta una estructura desordenada por lo que es susceptible a la hidrólisis cuando no se encuentra en la micela (Cheftel *et al.*, 1989).

La κ -caseína es una proteína que forma polímeros, no es una proteína sensible a la temperatura y a las fuerzas iónicas, como lo son las α -caseínas, por lo que es menos susceptible a hidrólisis (Fox, 1992).

De acuerdo a esta información, las proteínas con mayor susceptibilidad a ser hidrolizadas serían la α_{s2} , β y al final la α_{s1} caseína, lo cual dependerá fuertemente del pH del medio, ya que dependiendo del pH, cambia la estructura conformacional de las proteínas y por lo tanto los aminoácidos que puedan estar expuestos también se modifican.

Respecto al comportamiento de las enzimas, no se puede conocer la especificidad, ya que se trata de un complejo de diversas enzimas con diferente sitio de hidrólisis.

La actividad enzimática ligada a la pared celular de *S. thermophilus* también dependerá fuertemente de las condiciones de reacción, principalmente del pH.

La hidrólisis de las caseínas genera péptidos, los cuales han sido objeto de diversos estudios, (Silva y Malcata, 2005; Smacchi y Gobetti, 2000; Swaisgood y Clare, 2000; Meisel y Bockelman, 1999; Meisel *et al.*, 1997). El interés radica en la diversidad en cuanto a las actividades biológicas, que presentan estos péptidos derivados de caseínas. Recordemos que alrededor del 79% de los péptidos son generados de las caseínas.

En este estudio, no se determinaron los fragmentos hidrolizados de la proteína, pero existe la posibilidad de que los péptidos generados por el sistema proteolítico de *S. thermophilus* puedan tener algún tipo de propiedad biológica.

4.3.2 SUSTRATO: SEROALBÚMINA

En el presente estudio, se evaluó la velocidad de generación de péptidos (V_0) por las enzimas ligadas a la pared celular de *S. thermophilus* en seroalbúmina, ya que no existen estudios previos sobre la hidrólisis de seroalbúmina *por S. thermophilus*

Se calculó la pendiente de la generación de péptidos solubles en el tiempo de reacción y de esta manera, se obtuvieron las velocidades de generación de péptidos a los diferentes valores de pH a partir de seroalbúmina (Tabla 9).

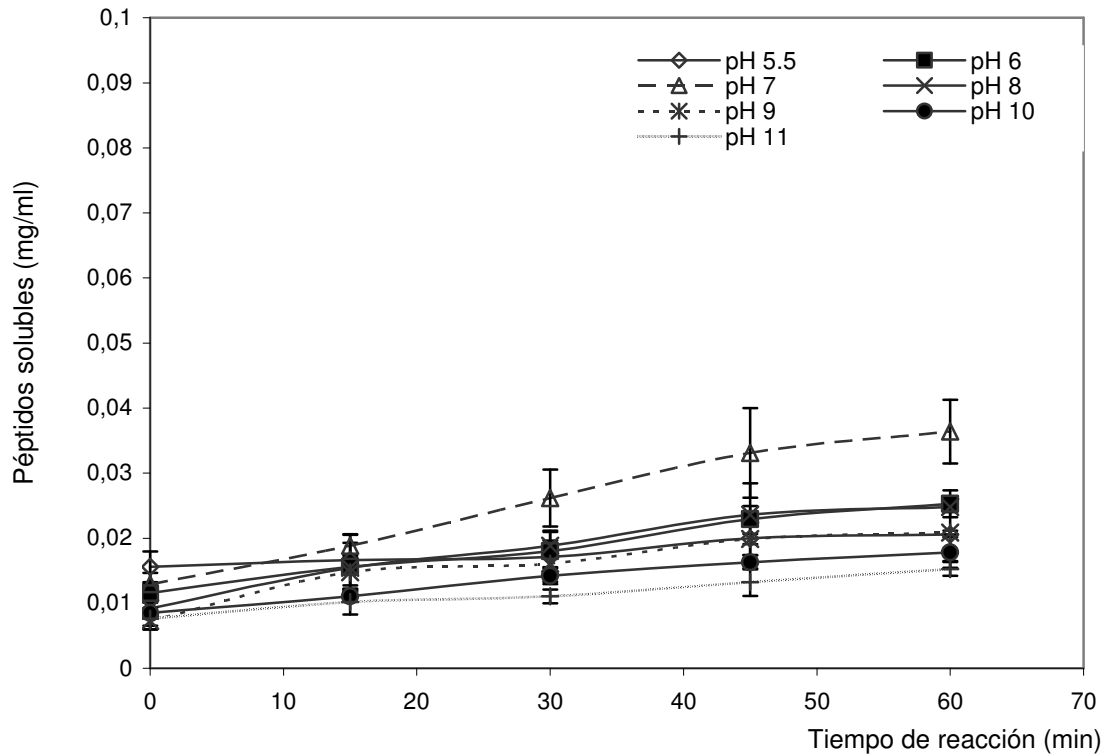


Figura 7. Generación de péptidos por *S. thermophilus* aislado de LC1 a partir de seroalbúmina al 1% a 37°C a diferentes valores de pH.

Al realizar el análisis estadístico de la velocidad de generación de péptidos (V_0) por seroalbúmina a los diferentes valores de pH, se encontró que existen diferencias significativas ($\alpha 0.05$) entre los diferentes valores de pH (Tabla 9). Se encontró la mayor velocidad de generación de péptidos (4.08×10^{-4} mg/ml min) a pH de 7.

Tabla 9. Velocidades de generación de péptidos (V_o) por *S. thermophilus* a partir de seroalbúmina a diferentes valores de pH.

pH	V_o (mg/ml min)
5.5	$8.82 \times 10^{-5} \text{ a}$
6	$2.32 \times 10^{-4} \text{ a}$
7	$4.08 \times 10^{-4} \text{ d}$
8	$2.03 \times 10^{-4} \text{ c}$
9	$8.82 \times 10^{-5} \text{ b}$
10	$1.60 \times 10^{-4} \text{ a}$
11	$1.22 \times 10^{-4} \text{ a}$

La mayor velocidad de generación de péptidos (V_o) con seroalbúmina se presentó a pH 7, este comportamiento posiblemente se encuentre relacionado con la estabilidad de la molécula de seroalbúmina. Se ha reportado que a valores extremos de pH, se presentan diferentes estructuras conformacionales que puede adoptar esta proteína, principalmente a pH básico (arriba de 9), en donde se presenta una disminución de la solubilidad de la proteína y por lo tanto una disminución de la exposición de grupos (Morrisey *et al.*, 1991). Este factor puede ser importante en el proceso de hidrólisis de la proteína.

Otro factor a considerar es la especificidad de las enzimas ligadas a la pared celular de *S. thermophilus*, ya que es clara la diferencia en la composición de aminoácidos entre sustratos (caseína y seroalbúmina), y por lo tanto la posibilidad de ser hidrolizadas por las enzimas. Esta diferencia en especificidad de las enzimas debido

a la composición de los sustratos, podría ser un factor importante en la diferencia de la velocidad de generación de péptidos. También se debe considerar que la estructura del complejo enzimático de *S. thermophilus* se encuentra también afectada por las condiciones de pH del medio.

A pesar que esta proteína fue poco hidrolizada por el sistema enzimático de *S. thermophilus*, existen estudios de que esta proteína puede ser hidrolizada por enzimas gástricas (quimosina y tripsina), ya que se han reportado 2 péptidos con actividad opioide derivados de los fragmentos 208-216 y 399-404 de seroalbúmina (Clare y Swaisgood, 2000). Por ello, cabe la posibilidad de que a pesar de que *S. thermophilus* tenga actividad baja sobre esta proteína, algunos de los péptidos generados durante la hidrólisis podrían tener actividad biológica.

4.3.3 SUSTRATO: LACTOFERRINA

A partir de las curvas de la Figura 8, se calculó la pendiente de la generación de péptidos solubles en el tiempo de reacción y de esta manera, se obtuvieron las velocidades de generación de péptidos (V_0) a los diferentes valores de pH a partir de lactoferrina (Tabla 10).

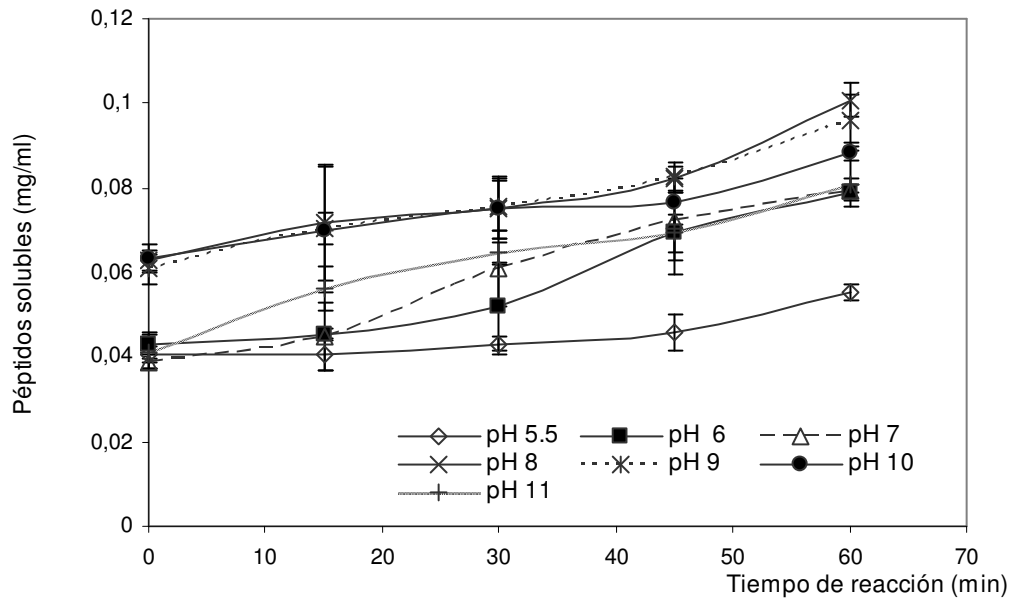


Figura 8. Generación de péptidos por *S. thermophilus* aislado de LC1 a partir de lactoferrina 1% a 37°C a diferentes valores de pH.

Tabla 10. Velocidades de generación de péptidos (V_o) por *S. thermophilus* a partir de lactoferrina diferentes valores de pH.

pH	V_o (mg/ml min)
11	$6.42 \times 10^{-4} b$
5.5	$2.28 \times 10^{-4} a$
6	$6.34 \times 10^{-4} b$
7	$7.23 \times 10^{-4} b$
8	$5.71 \times 10^{-4} b$
9	$5.47 \times 10^{-4} a$
10	$3.80 \times 10^{-4} a$

Al realizar el análisis estadístico de la velocidad de generación de péptidos (V_o), se encontró que existen diferencias significativas (α 0.05), entre los diferentes valores de pH (Tabla 10). A pH de 7, se encontró la velocidad más alta de generación de péptidos (7.23×10^{-4} mg/ml min), cuando se utiliza lactoferrina como sustrato

Existen reportes donde se ha comprobado que la lactoferrina es relativamente resistente a enzimas proteolíticas (Brines y Brock, 1983; Brock *et al.*, 1976.). Durante la degradación *in vitro* con tripsina y quimotripsina, se observó que estas dos enzimas no fueron eficaces para degradar lactoferrina, particularmente si esta proteína se encontraba en su forma saturada con hierro. Algunos fragmentos de lactoferrina fueron formados, pero la proteólisis fue muy limitada. También se observó que esta proteína no es hidrolizada por la pepsina o enzimas pancreáticas, durante la digestión. Esta resistencia de la lactoferrina es adecuada para acarrear el hierro presente en la leche (Lønnerdal e Iyer, 1995). Sin embargo en este estudio, se observó que el sistema proteolítico de *S. thermophilus* presenta una baja hidrólisis, aunque en seroalbúmina fue menor.

Meisel (1998), reporta un péptido llamado lactoferricina, derivado de la hidrólisis de la lactoferrina por pepsina, este péptido presenta importante actividad antimicrobiana contra microorganismos como son: *Kleibsell*a, *Salmonella*, *Proteus*, entre otros.

4.3.4 SUSTRATO: WPC 80

Se calculó la pendiente de la generación de péptidos solubles en el tiempo de reacción (Figura 9), y de esta manera, se obtuvieron las velocidades de generación de péptidos a los diferentes valores de pH a partir de WPC 80 (Tabla 11).

La actividad proteolítica de *S. thermophilus* aislado de LC1 sobre WPC 80 es mayor que en los otros sustratos utilizados En este caso se tiene una mayor velocidad de generación de péptidos (V_o).

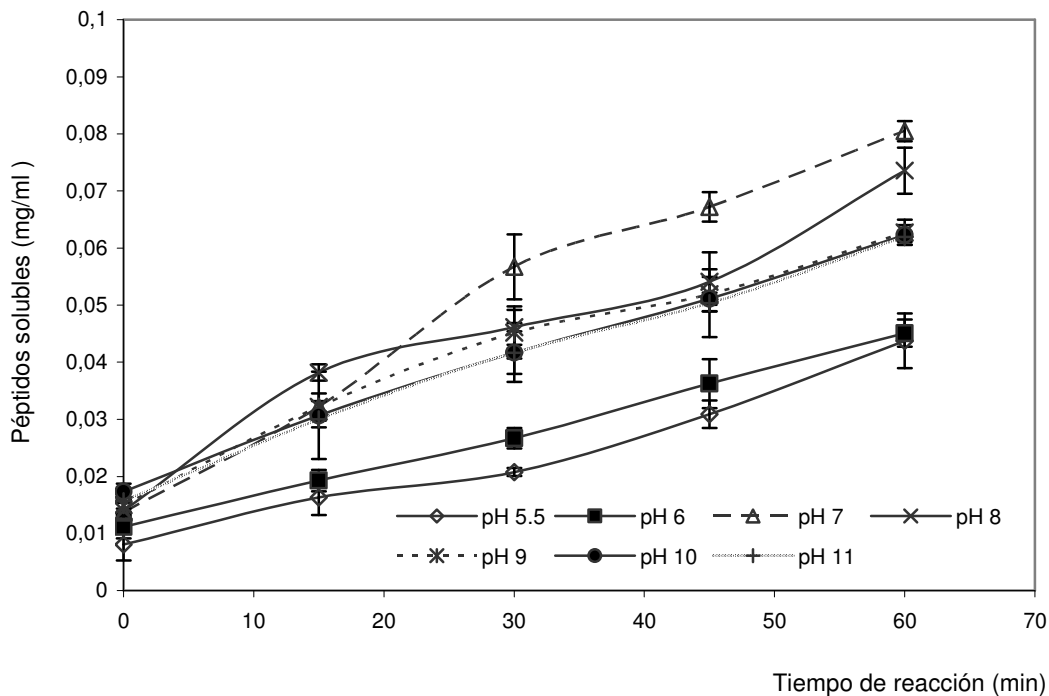


Figura 9. Generación de péptidos por *S. thermophilus* aislado de LC1 a partir de WPC 80 1% a 37°C a diferentes valores de pH.

Al realizar el análisis estadístico de la velocidad de generación de péptidos (V_0) por WPC 80 a los diferentes valores de pH, se encontró que existen diferencias significativas ($\alpha 0.05$). La máxima velocidad de generación de péptidos usando WPC 80 como sustrato, fue de 1.12×10^{-3} mg/ml min a pH de 7.

Con respecto al WPC 80, en la literatura existe un reporte de Harb *et al.*, (2003), sobre un estudio realizado acerca de la evolución de la α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina durante la fermentación con varias cepas de *S. thermophilus*. En este estudio se encontró que de las dos proteínas, la proteína que se hidrolizaba con mayor facilidad fue la α -lactoalbúmina, mientras que para hidrolizar la β -lactoglobulina se requería de tiempos prolongados de fermentación. Además ésta proteína se hidrolizó mejor cuando se encontraba en suero que en forma pura.

Tabla 11. Velocidades de generación de péptidos (V_o) por *S. thermophilus* a partir de WPC 80 a diferentes valores de pH

pH	V_o (mg/ml min)
5.5	$5.73 \times 10^{-4}{}^b$
6	$5.65 \times 10^{-4}{}^a$
7	$1.12 \times 10^{-3}{}^d$
8	$9.00 \times 10^{-4}{}^c$
9	$7.69 \times 10^{-4}{}^b$
10	$7.35 \times 10^{-4}{}^b$
11	$7.53 \times 10^{-4}{}^b$

La hidrólisis a mayores tiempos de incubación de la β -lactoglobulina puede deberse al cambio de estructura que esta proteína adquiere con el pH del medio, ya que se han observado diferentes asociaciones de las dos variantes genéticas de estas proteínas.

En la β -lactoglobulina, se ha reportado que a pH 6.6 se puede observar el dímero de esta proteína, en el rango de pH 3.5-5.2 se presenta en forma de octámero, a pH ácido extremo, la proteína se encuentra en forma de monómero (Fox, 1992).

Otra razón de los tiempos prolongados de hidrólisis en la β -lactoglobulina se debe a que es una proteína estructuralmente compleja, es un barril β antiparalelo formado por ocho láminas β acomodadas en dos grupos de cuatro, presenta tres giros en α -

hélice. Se forma un cáliz por las dos hojas β antiparalelas en el extremo N- terminal. El extremo C- terminal presenta otro espiral antiparalelo con láminas β (Uhrínova *et al.*, 2000).

La α -lactoalbúmina no presenta tantos cambios estructurales con la modificación del pH, ya que se han reportado dos tipos de conformaciones, una a pH ácido, menor a 5 y otra a pH mayor a 5. A pH mayor de 5, la conformación de esta proteína presenta una forma desnaturalizada, estructura que le permite ser hidrolizada (Fox, 1992).

La hidrólisis de las proteínas del suero tiene efectos importantes en la digestibilidad y en la producción de péptidos bioactivos. Es conocido que las proteínas del suero, especialmente la β -lactoglobulina y en menor proporción la α -lactoalbúmina son alergénicas. La hidrólisis de estas proteínas por bacterias lácticas puede disminuir esta alergenicidad (Harb *et al.*, 2003).

Existen péptidos bioactivos provenientes de la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina. En el caso de la β -lactoglobulina, se han reportado tres péptidos con actividad opioide, de diferentes fragmentos de la proteína. (Meisel, 2001; Clare y Swaisgood, 2000). Meisel, (2001), reporta un péptido con actividad opioide proveniente del fragmento 50-53 de la α -lactoalbúmina

A partir de las curvas de generación de péptidos por *S. thermophilus* de LC1 (Figuras 6 a 9), se calcularon las velocidades de generación de péptidos para cada sustrato y se construyó la Figura 10.

El WPC 80 y la caseína fueron las proteínas que proporcionaron los valores más altos en cuanto a la velocidad de generación de péptidos por *S. thermophilus* (Figura 10).

En esta Figura también se observa un pH óptimo diferente para cada sustrato y para el conjunto de enzimas ligadas a la pared celular de *S. thermophilus*: Se aprecia una velocidad de generación de péptidos más alta en el sustrato donde hay más de una

proteína, como es el caso de la caseína y el WPC 80. En las proteínas del suero (lactoferrina, seroalbúmina) y el WPC 80, el pH óptimo fue de 7, mientras que para la caseína el pH óptimo se presentó a pH de 8.

Al estudiar el perfil de la generación de péptidos de *S. thermophilus* con diferentes proteínas (Figura 10), se observó que el sustrato sobre el cual se presentó mayor generación de péptidos es el WPC 80 con un valor máximo de V_0 de 1.12×10^{-3} mg/ml min a pH 7, seguido de la caseína con un valor máximo de 8.76×10^{-4} mg/ml*min a pH 8, la lactoferrina presentó un valor de 7.24×10^{-4} mg/ml*min a pH 7 y la seroalbúmina presentó un valor de 4.08×10^{-4} .

El análisis de varianza de las 4 proteínas utilizadas, muestra que existe diferencia significativa entre las diferentes fuentes de proteínas utilizadas en este estudio, y que la proteína con mayor generación de péptidos es el WPC 80.

Es importante mencionar que el sistema proteolítico de las bacterias lácticas es muy complejo como lo han descrito diversos autores (Fernandez–Espla *et al.*, 2000; Law y Handrickman, 1997; Kok y De Vos 1994; Tjwantan, *et al.*, 1993). La actividad proteolítica que presentan es baja, generan péptidos en bajas concentraciones, información que confirma los valores obtenidos en las velocidades de generación de péptidos.

En este estudio, se tiene un sistema enzimático complejo, ya que se usaron las células completas de *S. thermophilus* aislado de LC1, el microorganismo tiene todo el equipo enzimático, desde proteasas, peptidasas y sistemas de transporte de péptidos.

Se ha reportado que la actividad peptidásica de *S. thermophilus* es superior a la de los lactobacilos, pero presenta baja actividad ligada a la pared celular, mientras que la capacidad de los lactobacilos para hidrolizar la caseína confirma una actividad proteasica muy superior en los lactobacilos. Este modelo de hidrólisis evidencia la

relación simbiótica entre estos microorganismos en diversos productos lácteos (Letort y Juillard, 2001; Fernandez-Espla *et al.*, 2000; Tamime y Robinson, 1991).

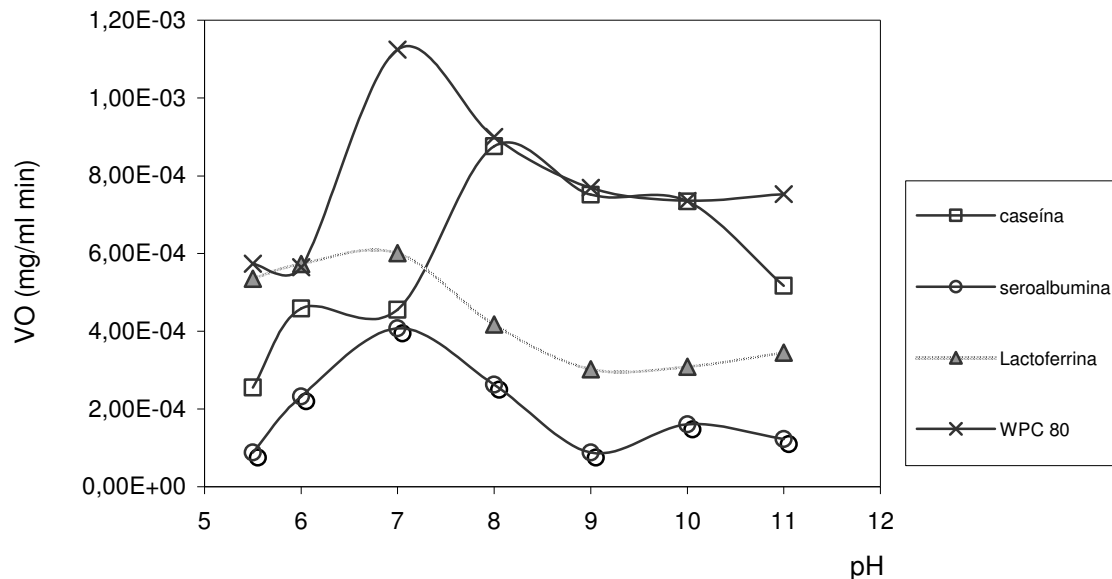


Figura 10. Generación de péptidos de *S. thermophilus* aislado de LC1 sobre proteínas de leche (caseína, seroalbúmina, WPC 80, lactoferrina), al 1% (p/v) a 37°C a diferentes valores de pH.

Diversas peptidasas de *S. thermophilus* han sido descritas: oligopeptidasa (Desmezaud, 1974); dipeptidasa (Rabier y Desmezaud, 1973); 2 aminopeptidasas generales homólogas a las de *L. lactis*: PepN (Midwinter y Dritchard, 1994; Rul *et al.*, 1995; Tsakalidou y Kalantzopoulos, 1992) y PepC (Chapot *et al.*, 1994).

Además dos peptidasas específicas equivalentes a las de *L. lactis*, Pep A, que es una aminopeptidasa específica para aminoácidos ácidos (Rul *et al.*, 1995), y Pep X, que es una X-prolil-dipeptidil-aminopeptidasa específica por prolina (Tsakalidou, *et al.*, 1998; Meyer y Yordi, 1987).

Fernandez-Espla y Rul, (1999), aislaron una oligopeptidasa y una aminopeptidasa de *S. thermophilus*, mientras que Chavagnat *et al.*, (2000), aislaron una oligopeptidasa

de *S. thermophilus*. A. Motoshima *et al.* (2003), purificaron y caracterizaron la secuencia de la lisil-aminopeptidasa de *S. thermophilus* YRC001.

Se han realizado estudios comparativos del sistema proteolítico de *L. lactis* y *S. thermophilus* (Rul y Monnet, 1997), encontraron 13 peptidasas homólogas y además se demostró que *S. thermophilus* posee dos peptidasas adicionales sin contraparte en *L. lactis*.

A pesar de que existen diversos reportes de la actividad proteolítica intracelular de *S. thermophilus*, poca es la información de la actividad enzimática a nivel extracelular.

Shahbal *et al.*, (1993), caracterizaron la actividad proteolítica ligada a la pared celular y encontraron una actividad del 41% en pared celular y una mayor velocidad de hidrólisis por la β -caseína comparado con la caseína α_{s1} .

Fernandez-Espla *et al.*, (2000), estudiaron y aislaron la enzima con actividad proteolítica ligada a la pared celular de *S. thermophilus* CNRZ 385, utilizando sustratos específicos para la enzima.

Se ha reportado que la especificidad de las proteasas *per se*, está estrechamente relacionada con las propiedades intrínsecas de las proteínas, ya que la hidrólisis de las proteínas es un proceso complejo, en este proceso parámetros como el doblamiento y la agregación posterior al rompimiento de la proteína juegan un papel muy importante (Kunji *et al.*, 1996).

En el presente estudio, se evaluó la actividad ligada a la pared celular de *S. thermophilus* de LC1 y al analizar el perfil de pH con caseína como sustrato, en donde se observó la velocidad de producción de péptidos de 8.76×10^{-4} mg/ml min a pH de 8, pudo comparar la información obtenida por Fernandez-Espla *et al.*, (2000), quienes estudiaron la actividad de una enzima aislada de la pared celular de *S. thermophilus* CNRZ 385, esta enzima mostró el 100% de la actividad a pH de 7.5, mientras que a pH de 8, mostró un 70% de la actividad.

4.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA POR ELECTROFORÉISIS DE LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS.

A partir de los experimentos que presentaron la mayor velocidad de generación de péptidos (V_0), se realizaron electroforesis tipo desnaturalizante para determinar cual era el perfil de degradación de las proteínas. Estos experimentos se realizaron con caseína y WPC 80.

La Figura 11 muestra la hidrólisis de caseína al 1% a pH de 8, al cual se observó la mayor velocidad de generación de péptidos (8.76×10^{-4} mg/ml min). A los 15 y 30 minutos, aparentemente no se aprecian productos de la hidrólisis de las proteínas, pero a partir de los 45 minutos, se pueden encontrar bandas en la parte inferior del gel que evidencian la hidrólisis de las caseínas.

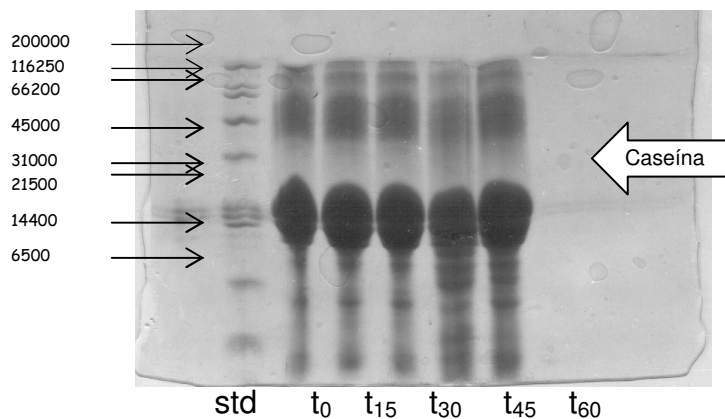


Figura 11. Electroforesis de caseína al 1% a pH 8 en gel de poliacrilamida-SDS desnaturalizante %T=14 y %C= 2.6. Std= patrón de pesos moleculares, t_0 - t_{60} = muestras de los diferentes tiempos de hidrólisis.

En la Figura 12 se observa el gel con las muestras obtenidas durante la hidrólisis de WPC 80 al 1% a pH de 7, ya que a este pH se obtuvo la mayor velocidad de generación de péptidos (1.12×10^{-3} mg/ml min). En el gel de electroforesis, se

observó la hidrólisis de la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina, aunque se pudo determinar una preferencia por la α -lactoalbúmina.

Harb *et al.*, (2003), reportaron que algunas cepas de *S. thermophilus* tienen mayor especificidad por la hidrólisis de la α -lactoalbúmina, ya que la β -lactoglobulina, requiere de mayor tiempo para la hidrólisis, debido a su estructura globular altamente estructurada.

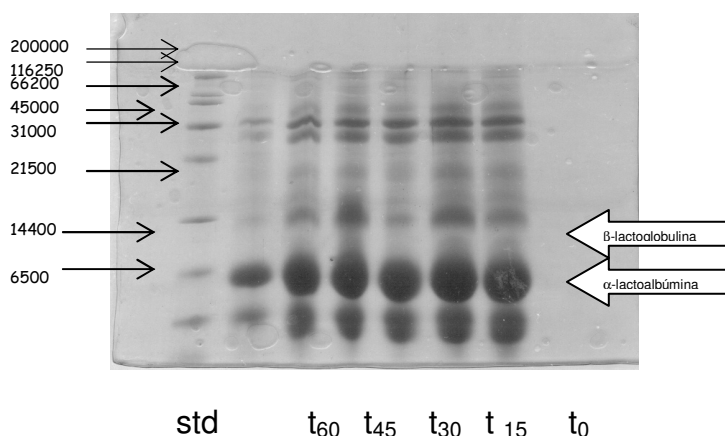


Figura 12. Electroforesis de WPC 80 al 1% a pH 7 en gel de poliacrilamida-SDS desnaturizante %T=14 y %C= 2.6. Std= patrón de pesos moleculares, t₀-t₆₀ = muestras de los diferentes tiempos de hidrólisis.

Con la ayuda del analizador de imágenes, se calculó la concentración de proteína en los diferentes tiempos de hidrólisis para el gel de WPC 80 (Figura 12), como se describe en la sección 3.9.3.

En la Figura 13, se presenta la evolución de la degradación de la α -lactoalbumina en el tiempo. Con estos datos fue posible calcular el porcentaje de degradación de esta proteína (26%). Para el caso de la caseína no fue posible determinar el porcentaje de degradación, pero es evidente que se forman productos de la hidrólisis de esta proteína (figura 11).

En el gel de electroforesis de caseína, se observa la presencia de péptidos a partir de los 45 min de reacción menores a 15 000 daltons.

Cabe mencionar que la técnica utilizada no es lo suficiente sensible para detectar péptidos de bajo peso molecular, por lo que en este caso es recomendable hacer una técnica específica para la determinación de péptidos.

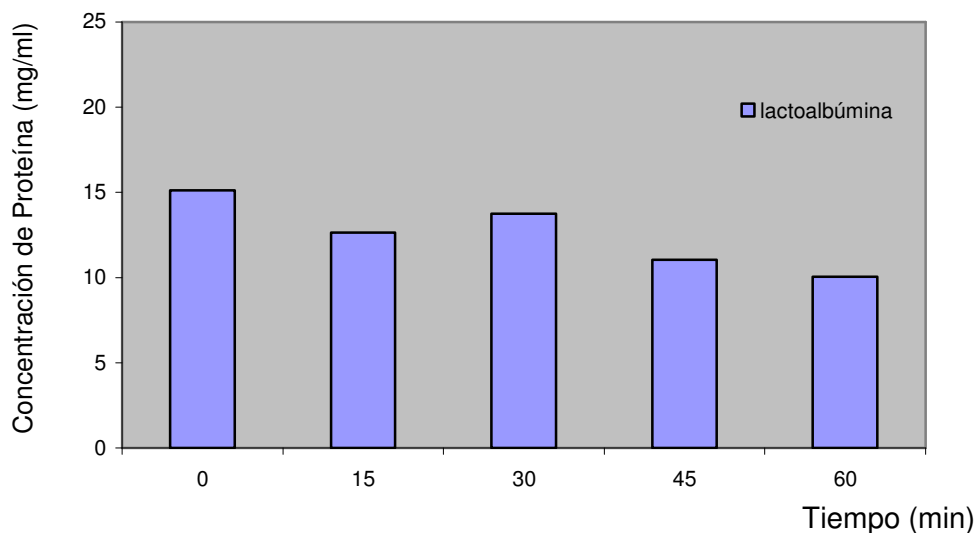


Figura 13. Evolución de la concentración de proteína (WPC 80 al 1% pH 7) por análisis de las imágenes del gel de electroforesis.

Los estudios del sistema proteolítico de *S. thermophilus* reportan que las peptidasas se encuentran en el interior del microorganismo (Rul *et al.*; 1995; Law y Haandrickman, 1995; Rul y Monnet, 1997; Tsakalidou *et al.*, 1998; Chavagnat *et al.*, 1999; Fernandez-Espla y Rul, 1999; Chavagnat *et al.*, 2000; Garault *et al.*; 2000; Garault *et al.*, 2002).

Al tener solo actividad extracelular, no hay mucha posibilidad de generar péptidos de menor tamaño, ya que las proteasas se encuentran envueltas en la degradación inicial de la proteína, formando un gran número de oligopéptidos, que posteriormente deberán ser hidrolizados por diferentes peptidasas intracelulares para dar origen a

péptidos de bajo peso molecular lo que sería deseable para generar péptidos bioactivos ya que estos poseen un peso molecular más bajo (Kunji *et al.*; 1996; Meisel, 1998; Meisel, 20001).

Dichos péptidos tendrían que ser secretados, sin embargo bajo las condiciones experimentales no se pudo determinar si este fenómeno se encontraba presente, posiblemente por los tiempos de hidrólisis o por las técnicas de análisis utilizadas.

5. CONCLUSIONES

Se aisló *S. thermophilus* de la leche fermentada LC1 y se caracterizó la curva de crecimiento.

Mediante el sistema de reacción que se utilizó en este estudio (resting cells = células en reposo) se pudo medir la velocidad de generación de péptidos por enzimas ligadas a la pared celular de *S. thermophilus*.

A partir de los resultados del diseño experimental, se encontró que la interacción entre la concentración de CaCl_2 y pH ensayados presentó un efecto en velocidad de generación de péptidos por *S. thermophilus* aislado de LC1 a partir de la caseína. El pH fue el factor que presentó mayor efecto en la velocidad de generación de péptidos.

El microorganismo hidroliza las proteínas de la leche en diferente proporción, solo fue capaz de generar péptidos en cantidades apreciables a partir de caseína y α -lactoalbúmina. Su sistema proteolítico funciona mejor en un rango de pH entre 7 y 8.

Las proteínas menos susceptibles a la hidrólisis fueron la lactoferrina y la seroalbúmina.

Por la técnica de electroforesis se pudo determinar la presencia de péptidos de peso molecular menores 15000 daltons por la hidrólisis de la caseína a los 45 y 60 minutos de reacción. Sin embargo la técnica no fue la adecuada para obtener el peso molecular de esos péptidos.

El sistema propuesto de resting cells permitió determinar la actividad proteolítica de las células "in vitro".

6. PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se estudió el sistema proteolítico de *S. thermophilus* de la leche fermentada LC1. Este microorganismo mostró actividad proteolítica característica del género de las bacterias lácticas, la cual es reportada como baja comparada con otros organismos. Bajo las condiciones de estudio, *S. thermophilus* de LC1 demostró que es capaz de generar péptidos a partir de caseína y α -lactoalbúmina. Sin embargo, con las técnicas de análisis no se pudo determinar si los péptidos generados ejercían alguna bioactividad, por lo que a continuación se citan algunos estudios complementarios a este trabajo:

- Estudiar la actividad proteolítica en fracciones o en células permeabilizadas, para conocer de manera más puntual la actividad proteolítica en las diferentes fracciones de las células (pared celular, membrana citoplasmática y citoplasma), utilizando las mismas condiciones de trabajo, sistema de reacción, sustratos, temperatura y rangos de pH.
- Ensayar tiempos de hidrólisis mayores de hasta 6 hrs, según lo reportado por Shahbal *et al.*, (1993).
- Utilizar técnicas de análisis más sensibles como electroforesis capilar o HPLC para determinar los péptidos generados.
- Una vez obtenidos los péptidos, se podría considerar realizar estudios para conocer su bioactividad.
- Los péptidos podrían ser agregados a algún alimento para incrementar sus propiedades funcionales.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AENOR (1986). NORMAS FRANCESA PARA EL CONTRO DE CALIDAD DE PRODUCTOS LECHEROS.
- Akpemado K.M and Bracquart P.A. *S.thermophilus*: (1983). UPTAKE OF BRANCHED-CHAIN AMINO ACIDS BY *Streptococcus thermophilus*. Applied and Environmental Microbiology 45: 136-140.
- Atlan D., Laloï P., Portalier R. (1990). X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase OF lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus: CHARACTERIZATION OF THE ENZYME AND ISOLATION OF DEFICIENT MUTANTS. Applied Environmental Microbiology 56: 2174-2179.
- Baró L., Martínez-Férez A., Jiménez J y Bouza J. (2001). PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS DE LA LECHE CON PROPIEDADES FUNCIONALES. Archives Pharmaceutica, 42:3-4; 135-145.
- Belem M., Gibbs B. and Lee H. (1999). PROPOSING SEQUENCES FOR PEPTIDES DERIVED FROM WHEY FERMENTATION WITH POTENTIAL BIOACTIVE SITES. Journal Dairy Science 82: 486-493.
- Bensussan N (2002). NEW INSIGHT INTO DIRECT ROLE OF LACTIC ACID BACTERIA IN LACTOSE DIGESTION. Yoghurt and fermented milks letter No. 8. p 1.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1978). Eight edition. Edit. Williams and Wilkins.
- Beshkova D., Simova E., Frengova G., and Simov Z. (1998). PRODUCTION OF AMINO ACIDS BY YOGURT BACTERIA. Biotechnology Prog. 14: 963-965.

- Brines RD, Brock JH. (1983). THE EFFECT OF TRYPSIN AND CHYMOTRYPSIN ON THE IN VITRO ANTIMICROBIAL AND IRON-BINDING PROPERTIES OF LAETOFERFIN IN HUMAN MILK AND BOVINE EOLOSTRUM: UNUSUAL RESISLANCE OF HUMAN LACTOFERRIN TO PROTEOLYFIC DIGESTION. *Biochemistry. Biophysyc. Acta* 759:229-35
- Brock JH, Arzabe F, Lampreave F, Pineira A. (1976). THE EFFECT OF TRYPSIN ON BOVINE TRANSFERRIN AND LACTOFERRIN. *Biochemistry. Biophysycs. Acre* 446:214-2
- Brody, E.P. (2000), BIOLOGICAL ACTIVITIES OF BOVINE GLYCOMACROPEPTIDE. *British Journal of Nutrition* 83: 39-46.
- Chapot-Chartier M.P., Rul F., Nardi Mand Grippon J.C. (1994). GENE CLONING AND CHARACTERIZATION OF PepC, A CYSTEINE AMINOPEPTIDASE FROM *Streptococcus thermophilus*, WITH SEQUENCES SIMILARITY TO THE EUKARYOTIC BEOMYCIN HYDROLASE. *European Journal of Biochemistry* 224: 497-506.
- Chavagnat F., Casey M., and Meyer J. (1999). PURIFICATION, CHARACTERIZATION. GENE CLONING, SEQUENCING, AND OVEREXPRESION OF AMINOPEPTIDASE N FROM *Streptococcus thermophilus* *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3001- 3007.
- Chavagnat F., Meyer J., and Casey M.G. (2000).PURIFICATION, CHARACTERIZATION, CLONING ANS SEQUENCING OF THE GENE ENCODING OLIGOPEPTIDASE PEPO FROM *Streptococcus thermophilus* A. *FEMS microbiology letters* 191:79-85.
- Cheftel J.C., Cuq J.L., Lorient D. (1989). PROTEÍNAS ALIMENTARIAS. 1a. edición. Edit. Acribia, Zaragoza España.

- Clare D.A and Swaisgood, H E. (2000). BIOACTIVE MILK PEPTIDES: A PROSPECTUS. *Journal of Dairy Science* 83:1187-1195.
- Dekker M, (2001). APPLIED DAIRY MICROBIOLOGY, 2nd Edition. Edited by Elemer H. Marth.
- Desmazeaud M.J. (1974). GENERAL PROPERTIES AND SPECIFICITY OF ACTION OF A NEUTRAL INTRACELLULAR ENDOPEPTIDASE FROM *Streptococcus thermophilus*. *Biochimie* 56: 1173-1181.
- Dionysius, D.A. and Milne J.M. (1998), ANTIBACTERIAL PEPTIDES OF BOVINE LACTOFERRIN: PURIFICATION AND CHARACTERIZATION, *Journal of Dairy Science* 80, 664-674.
- Fernandez- Espla M., Garault P., Monnet V. And Rul F. (2000). *Streptococcus thermophilus* CELL WALL- ANCHORED PROTEINASE: RELEASE, PURIFICATION AND BIOCHEMICAL AND GENETIC CHARACTERIZATION. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4772- 4778.
- Fernandez-Espla M.D., Rul F. (1999). PEPS FROM STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS A NEW MEMBER OF THE AMINOPEPTIDASE T FAMILY OF THERMOPHILIC BACTERIA. *Journal of Biochemistry* 263, 502-510.
- Fox P.F. (1992). ADVANCED DAIRY CHEMISTRY V 1: PROTEINS, editor Fox P.F. edit. Elsevier Science Publishing Co. INC. Essex, U.K.
- Ganjam, L.S., Thornton, W.H., R.T. and Mac Donald, R. S. (1997). ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF YOGURT FRACTIONS OBTAINED BY MEMBRANE DIALYSIS ON CULTURED MAMMALIAN INTESTINAL CELLS. *Journal of Dairy Science* 80: 2325-2329.

- Garault P., Le Bars D., Besset C., Monnet V. (2002). THREE OLIGOPEPTIDE BINDING PROTEINS ARE INVOLVED IN THE OLIGOPEPTIDE TRANSPORT OF *Streptococcus thermophilus*. The Journal of Biological Chemistry 227:1, 32-39.
- García H., Duhalt R. (1998). CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: UNA REVISIÓN. Biotecnología 3, 77-88.
- García-Garibay M. (2004). PRODUCTOS LÁCTEOS EN: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA 2ª. Edición, Edit. Limusa pp 162 – 191.
- Gobetti M., Ferranti P., Smacchi E and Addeo Richard. (2000). PRODUCTION OF ANGIOTENSIN- I- CONVERTING ENZYME- INHIBITORY PEPTIDES IN FERMENTED MILKS STARTED BY *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* SS1 AND *lactococcus lactis subsp. cremoris* FT4. Applied and Environmental Microbiology, 66: 3898-3904.
- Guarner F. (2002). PROBIOTICS IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASES. Yoghurt and fermented milks: benefits of live cultures. International symposium. Paris, September 25 2002.
- Guimont Ch. (2002). CHANGE OF FREE AMINOACIDS IN M17 MEDIUM AFTER GROWTH OF *Streptococcus thermophilus* AND IDENTIFICATION OF GLUTAMINE TRANSPORT ATP- BINDING PROTEIN. International Dairy Journal 12:729-736.
- Harb-Bertrand C., Ivanova I.V. Dalgalarondo M., Haertlé T. (2003). EVOLUTION OF β - LACTOGLOBULIN AND α -LACTOALBUMIN CONTENT DURING YOGHURT FERMENTATION. International Dairy Journal 13: 39-45.

- Harsharnjit S., Doull F., Rutherford K., and Cross M., (2000) IMMUNOREGULATORY PEPTIDES IN BOVINE MILK. *British Journal of Nutrition* 84: S111- S117.
- Holzapfel W.H.J. P., Snel J. Schillinger U., and Huis in't Veld (1998). OVERVIEW OF GUT FLORA AND PROBIOTICS. *International Journal of Food Microbiology* 41:85-101
- Ishige T., Honda K., Shimizu S. (2005). WHOLE ORGANISM BIOCATALYSIS. *Current Opinion in Biotechnology* 9: 174-180.
- Juillard V., Dominique L., Kunji E., Konings W., Grpon J.C., and Richard J. (1995)a. OLIGOPEPTIDES ARE THE MAIN SOURCE OF NITROGEN FOR *LACTOCOCCUS LACTIS* DURING GROWTH IN MILK. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3024 – 3030.
- Juillard V., Laan h., Kunji E., Strathing-Jeronimus M., Bruins A., and Konings W. (1995)b. THE EXTRACELLULAR P₁- TYPE PROTEINASE OF *Lactococcus lactis* hydrolyzes β - CASEIN INTO MORE THAN ONE HUNDRED DIFFERENT OLIGOPEPTIDES. *Journal of Bacteriology* 177: 3472- 3478.
- Kalantzopoulos G. (1997). FERMENTED PRODUCTS WITH PROBIOTIC QUALITIES. *Anaerobe* 3: 185- 190.
- Kitts D., and Yuan Y., (1992). CASEINOPHOSHOPEPTIDES AND CALCIUM Bioavailability *Trends in Food Science & Technology* 3:31-34.
- Kok J., and De Vos W. (1994). THE PROTEOLYTIC SYSTEM OF LACTIC ACID BACTERIA EN GENETICS AND BIOTECHNOLOGY OF LACTIC ACID BACTERIA. Edited by Blackie academic & Professional.

- Kranenburg R., Kleerebezem M., Vlieg J., Ursing B., Boekhorst J., Smit A., Ayad E., Smit g., and Siezen R. (2002). FLAVOUR FORMATION FROM AMINO ACID BY LACTIC ACID BACTERIA: PREDICTIONS FROM GENOME SEQUENCE ANALYSIS. *International Dairy Journal* 12: 111- 121
- Kunji E., Mierau I., Hagting A., Poolman B., Konings W. (1996). THE PROTEOLYTIC SYSTEM OF LACTIC ACID BACTERIA. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 187-221.
- Law J. and Handrikman A. (1997). PROTEOLYTIC ENZYMES OF LACTIC ACID BACTERIA. *International Dairy Journal* 7:1-11.
- Letort C and Juillard V. (2001). DEVELOPMENT OF A MINIMAL CHEMICALLY-DEFINED MEDIUM FOR THE EXPONENTIAL GROWTH OF *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Applied Microbiology* 91: 1023-1029.
- Lönnerdal B. Iyer S. (1995). LACTOFERRIN: MOLECULAR STRUCTURE AND BIOLOGICAL FUNCTION. *Annu Rev.* 15:93-110.
- Lowry O.H., Rosebrough N., Farr A.L., and Randall R.J. (1951). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT *Journal of Biological Chemistry.* 193:265
- Meisel H. (1993). CASOKININS AS INHIBITORS OF ACE in Sawatzk. G and Re B. (Eds). *New perspectives in infant nutrition* (pp 153-159). Thieme Stuttgart N.Y.
- Meisel H. (1998). OVERVIEW ON MILK PROTEIN. DERIVED PEPTIDES *International Dairy Journal* 8: 363-373.
- Meisel H. and Bockelmann W. (1999). BIOACTIVE PEPTIDES ENCRYPTED IN MILK PROTEINS: PROTEOLYTIC ACTIVATION AND

- THROPO.FUNCTIONAL PROPERTIES. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 207-215.
- Meisel, H. (2001). BIOACTIVE PEPTIDES FROM MILK PROTEINS: A PERSPECTIVE FOR CONSUMERS AND PRODUCERS. *The Australian Journal of Dairy technology* 56: 83-92.
 - Meisel, H., and Schlimme, E, (1990) MILK PROTEINS; PRECURSORS OF BIOACTIVE PEPTIDES. *Trends in Food Science & Technology* 1: 41-43
 - Meisel, H., Goepfert, A. and Günther, S (1997) ACE INHIBITORY ACTIVITIES IN MILK PRODUCTS. *Milchwissenschaft* 52: 307-311
 - Meyer J. and Jordi R. (1987). PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF X- PROLYL-DIPEPTIDYL-AMINOPEPTIDASE FROM *lactobacillus lactis* AND *Streptococcus thermophilus*. *Journal Dairy Science* 70: 738-745.
 - Midwinter R.G. and Pritchard G.G. (1994). AMINOPEPTIDASE N FROM *Streptococcus salivarius* subsp. NCDO 573: PURIFICATION AND PROPERTIES. *Journal of Applied Bacteriology* 77: 288-295.
 - Morrissey P.A., Mulvihill D.M., O`Riordan D. (1991). FUNCTIONAL PROPERTIES OF BLOOD PROTEINS IN DEVELOPMENTS IN FOOD PROTEINS. Edited by Elsevier Applied Science NY.
 - Motoshima H., Shiraishi T., Tsukasaki F., and Kaminogawa S. (2003). PURIFICATION, CHARACTERIZATION, AND GENE CLONING OF LYSYL AMINOPEPTIDASE FROM *Streptococcus thermophilus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 67(4), 772-782.
 - Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S. and Tacaño, T. (1995). PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ANGIOTENSIN- I-

CONVERTING ENZYME INHIBITORS FROM SOUR MILK. Journal of Dairy Science 8: 777-783.

- Poolman B., Kunji E., Hagting A., Juillard V., and Konings W. (1995). THE PROTEOLYTIC PATHWAY OF *Lactococcus lactis*. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement 79:65S- 75S.
- Rabier D. and Desmezaud M.J. 1973. INVENTAIRE DES DIFFÉRENTES ACTIVITÉS PEPTIDASIQUES INTRACELLULAIRES DE *Streptococcus thermophilus*. Biochimie 55 :389-404.
- Reid g. (2000). PROBIOTIC THERAPY AND FUNCTIONAL FOODS FOR PREVENTION OF URINARY TRACT INFECTIONS. State of the Arland Science Infect Disease Dec 2(6) 518-522.
- Reuter G. (1997). PRESENT AND FUTURE OF PROBIOTICS IN GERMANY AND IN CENTRAL EUROPE. Bioscience Microflora 16: 43-51.
- Rokka T., Syväoja E and Tuominen J. (1997). RELEASE OF BIOACTIVE BY ENZYMATIC PROTEOLYSIS OF *Lactobacillus gg* fermented UHT MILK, Milchwiissenschaft 52 (12)
- Rowland I. (2002). LIVE CULTURES AND CANCER PREVENTION. Yoghurt & fermented milks: benefits of live cultures International symposium. Paris, 25 september 2002.
- Rul F. and Monnet V. (1997). PRESENCE OF ADDITIONAL PEPTIDASES IN *Streptococcus thermophilus* CNRZ 302 COMPARED TO *Lactococcus lactis*. Journal of Applied Microbiology 82, 695-704.

- Rul F., Gripon J.C. and Monnet V. (1995). ST- PEP A, A *Streptococcus thermophilus* AMINOPEPTIDASE WITH HIGH SPECIFICITY FOR ACIDIC RESIDUES. *Microbiology*, 141, 2281-2287.
- Ryhänen E., Pihlanto A., and Pakkala E. (2001). A NEW TYPE OF RIPENED, LOW- FAT CHEESE WITH BIOACTIVE PROPERTIES. *International Dairy Journal* 11: 441-447
- Schaafsma G. (2002). THE CONCEPT AND DEFINITION OF PROBIOTICS. *Yoghurt and fermented milks: benefits of live cultures. International symposium. Paris, September 25 2002.*
- Schmitz R.A. (2000). INTERNAL GLUTAMINE AND GLUTAMATE POOLS IN *Klebsiella pneumoniae* GROWN UNDER DIFFERENT CONDITIONS OF NITROGEN AVAILABILITY. *Current Microbiology* 41: 357-362-
- Shahbal S., Hemme D. and Renaultz P. (1993). CHARACTERIZATION OF A CELL ENVELOPE-ASSOCIATED PROTEINASE ACTIVITY FROM *Streptococcus thermophilus* H-STRAINS, *Applied and Environmental Microbiology* 59:177-182.
- Shihata A. and Shah N.P. (2000). PROTEOLYTIC PROFILES OF YOGURT AND PROBIOTIC BACTERIA. *International Dairy Journal* 10, 401-408.
- Silva S.V. and Malcata F.X. (2005). CASEINS AS SOURCE OF BIOACTIVE PEPTIDES. *Internacional Dairy Journal* 15, 1-15.
- Smacchi E. And Gobbetti M. (2000). BIOACTIVE PEPTIDES IN DAIRY PRODUCTS: SYNTHESIS AND INTERACTION WITH PROTEOLYTIC ENZYMES. *Food Microbiology* 17: 129-141

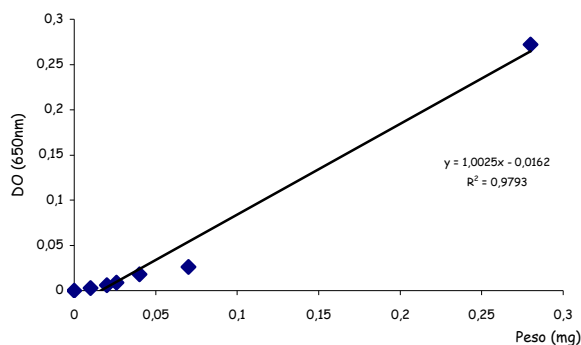
- Smid E., Poolman B., and Konings W. (1991). CASEIN UTILIZATION BY LACTOCOCCI. *Applied and environmental microbiology* 57: 2447-2452.
- Strom, M.B., Rekdal, O. and Svendsen, J.S. (2000), ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF 15 RESIDUE LACTOFERRICIN DERIVATIVES. *Journal Peptide Research* 56: 265-274
- Swaisgood H. and Clare D.A. (2000) BIOACTIVE MILK PEPTIDES: A PROSPECTUS *Journal of Dairy Science*. 83: 1187-1195.
- Syndifrais. (2002). YOGHURTS AND FERMENTED MILK .Letter no 6 p1
- Tamime A. and Robinson R. (1991). BIOQUÍMICA DE LA FERMENTACIÓN en: *Yogur Ciencia y Tecnología* Edit. Acribia Pp 268-276.
- Tjwantan B., Poolman B., and Konings W. (1993). PROTEOLYTIC ENZYMES OF *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Research* 60: 269-286.
- Torres, M. R. (2000). MICROBIOLOGÍA DE LAS BACTERIAS CON CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS. 2º. Simposio mexicano de probióticos.
- Tsakalidou E. and Kalantsopoulos G. (1992). PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF AN INTRACELLULAR AMINOPEPTIDASE FROM *Streptococcus salivarius ssp thermophilus*. *Journal of Applied Bacteriology* 72: 227-232.
- Tsakalidou E., Anastasiou R., Papadimitriou K., Manolopoulou E. and Kalantzopoulos G. (1998). PURIFICATION AND CHARACTERISATION OF AN INTRACELLULAR X- PROLYL- DIPEPTIDYL AMINOPEPTIDASE FROM *Streptococcus thermophilus* ACA- DC 4. *Journal of Biotechnology* 59, 203-211.

- Uhrínova S., Smith M., Jameson G., Uhrín D., Sawyer L and Barlow P. (2000). STRUCTURAL CHANGES ACCOMPANYING pH INDUCED DISSOCIATION OF THE β - LACTOGLOBULIN DIMER. *Biochemistry* 39, 3565-3574.
- Vinderola C. and Reinheimer J. (2000), ENUMERATION OF *Lactobacillus casei* IN PRESENCE OF *L. acidophilus*, *BIFIDOBACTERIA* AND LACTIC STARTER BACTERIA IN FERMENTED DAIRY PRODUCTS. *International Dairy Journal* 10, 271-275.
- Yan T.R., Ho S.C., Hou C.L. (1992). CATALYTIC PROPERTIES OF x-prolyl dipeptidyl aminopeptidase FROM *Lactococcus lactis subsp. Cremoris* nTR. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 56: 704-707.

8. APÉNDICES

Apéndice 1. Curva patrón de crecimiento bacteriano de *S. thermophilus* de LC1

En caldo MRS, se inoculó *S. thermophilus* de LC1 al 1%, se incubó a 42°C y se monitoreó el crecimiento por densidad óptica, hasta alcanzar la absorbancia de 2.6. En este momento, se realizaron diluciones 10^{-1} – 10^{-6} , a estas diluciones, se les midió densidad óptica y posteriormente se realizó la filtración en membranas de 0.20µm y se secaron en el horno a 70°C hasta peso constante.



Apéndice 2. Curvas estándar de proteínas y preparación de reactivos del método de Lowry.

Las curvas estándar que se utilizaron para determinar péptidos solubles por el método de Lowry, se realizaron con seroalbúmina, caseína, lactoferrina y WPC80, de la siguiente forma:

Se preparó una solución patrón de la proteína con una concentración de 1 mg/ml que se diluyó a diferentes concentraciones (0, 20, 40, 60, 80 y 100 µg /ml), para cubrir un intervalo de 0 a 100 µg /ml.

Reactivos

A Na_2CO_3 (J.T. Baker) al 2% en NaOH (J.T. Baker) 0.1N

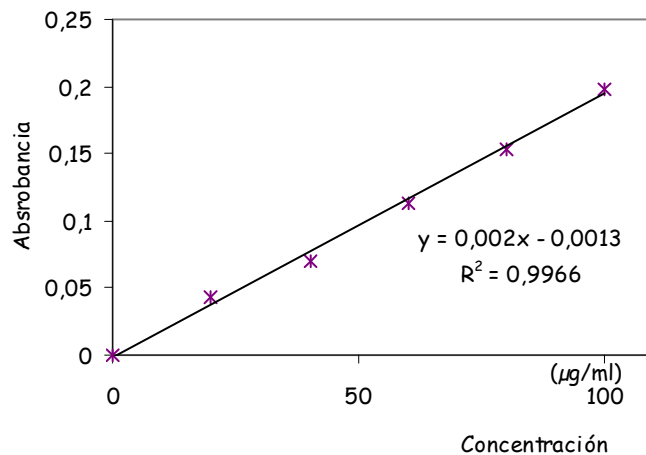
B CuSO_4 (J.T. Baker) al 1% en H_2O

C Tartrato de Na y K (J.T. Baker) al 2% en H_2O

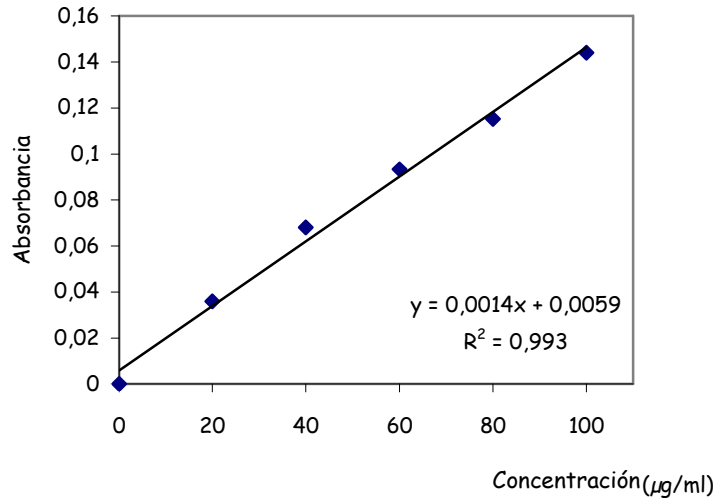
D Reactivo de Folin Ciocalteu (Sigma) 1:1 en agua

Procedimiento

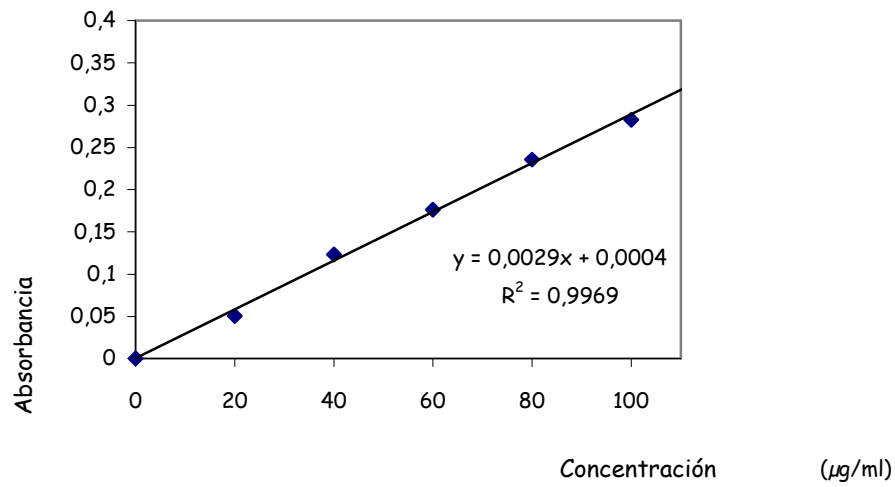
1. Se mezclaron 50 volúmenes de A + 1 volumen de B + 1 volumen de C, de esta solución se tomaron 5 ml y se les agregó 1 ml de muestra.
2. Después de dejar reposar 10 minutos, en la oscuridad, se agregaron 0.5 ml de reactivo D.
3. Finalmente se dejó reposar 30 minutos en la oscuridad y se leyó a λ_{590} nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 A.



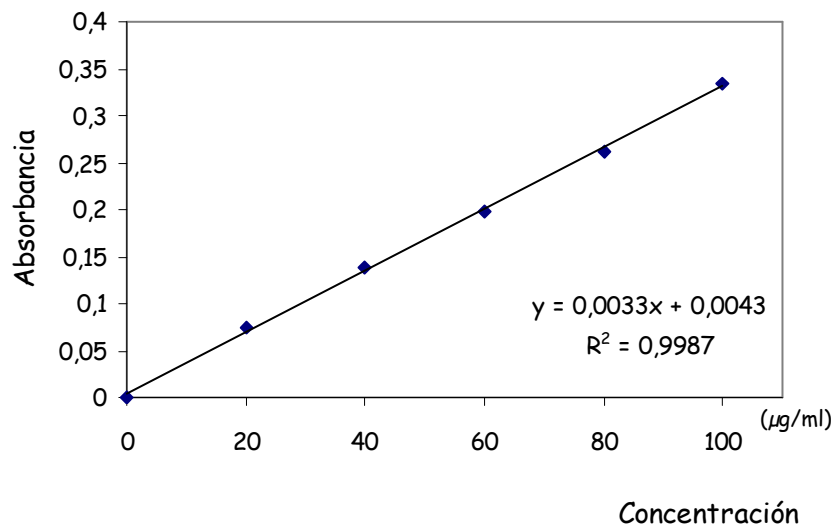
a) Curva patrón de seroalbúmina



b) Curva patrón de lactoferrina



c) Curva patrón de caseína

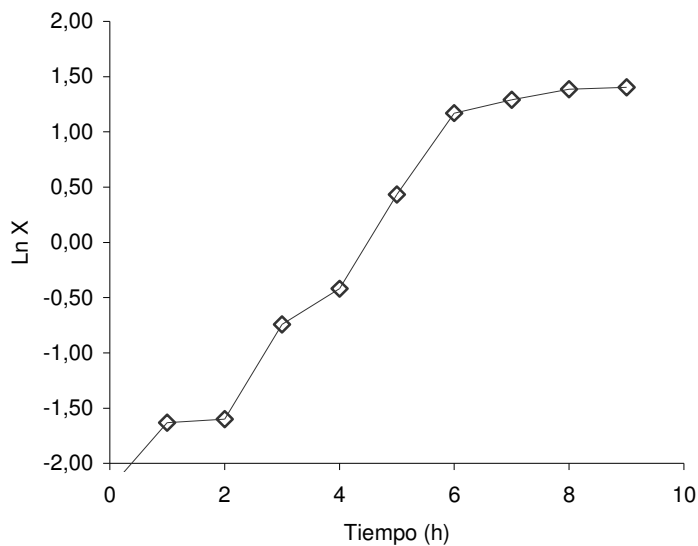


d) Curva patrón de WPC 80.

Apéndice 3 Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación de *S. thermophilus* de LC1.

A partir de los datos de densidad óptica, se calculó el logaritmo de los valores de densidad óptica, graficando los valores logarítmicos de la densidad óptica vs tiempo.

Posteriormente, se graficaron los valores de la etapa de crecimiento exponencial, obteniendo la pendiente, que es la velocidad de crecimiento, que en este caso fue de 0.67



Cinética de crecimiento de *S. thermophilus* de LC1.

Finalmente se obtuvo el tiempo de duplicación con la ecuación: $t_d = (\ln 2 / \mu)$, el cual fue de 1 hora.

Apéndice 4a Preparación de soluciones para electroforésis.

- **Solución Stock de acrilamida (14%T y 2.6% C)**

Porcentaje de acrilamida 14%

Porcentaje de bisacrilamida 2.6%

- **Composición del gel de separación.**

Solución stock de acrilamida 3.73 ml

Buffer de separación pH 8.8 4.26 ml

- **Solución amortiguadora de separación.**

1.5 M de Tris

Ajustar el pH a 8.8

- **Solución amortiguadora de concentración.**

0.5 M de Tris

Ajustar el pH a 6.8

- **Solución amortiguadora de la muestra**

Agua desionizada 1.9 ml

Glicerol 0.4 ml

Buffer tris -HCl 1.5 M pH 6.8 0.5 ml

SDS 10% 0.8 ml

Azul de bromofenol 1% 0.2 ml

- **Solución amortiguadora de corrida.**

0.1 M de Tris

0.1 % SDS

Ajustar el pH a 8.3 con HCl

Apéndice 4b Técnica de electroforesis (Shahbal *et al*, 1993).

1. Se montaron los cristales de electroforesis en las bases del equipo Miniprotean III (Biorad).
2. Se preparó el gel de separación con una concentración de acrilamida de 14%, se colocaron en un matraz Kitazato, 3.73 ml de solución de acrilamida, 4.26 ml de buffer de separación pH 8.8 y 80µl de SDS, se desgasificó durante 15 min, posteriormente se agregaron 40 µl de persulfato de amonio y 4µl de TEMED, se agitó suavemente. Se inyectó la solución a los cristales a 4/5 partes del total del gel.
3. Una vez polimerizado el gel de separación, se preparó el gel de concentración con una concentración de acrilamida de 5%. En un matraz Kitazato, se colocaron 0.666 ml de solución de acrilamida, 3.33 ml de buffer de concentración pH 6.8 y 40µl de SDS, se desgasificó durante 15 min, posteriormente se agregaron 20 µl de persulfato de amonio y 2µl de TEMED, se agitó suavemente. Se inyectó la solución a los cristales y se insertó cuidadosamente el peine, para la formación de los carriles.
4. Una vez polimerizado el gel de concentración, se removieron los peines y se montaron los cristales dentro de la cámara donde se llevó a cabo el paso de corriente.
5. Se agregaron 300 ml del buffer de corrida dentro de la cámara.
6. Se inyectaron las muestras (previamente preparadas), en cada uno de los carriles.
7. La corrida de electroforesis se realizó a 30 mV por dos horas.

Iztapalapa, D.F. a 9 de marzo de 2006

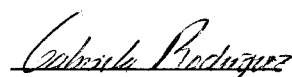
El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
tesis

**Hidrólisis de proteínas de leche por bacterias lácticas de leches
fermentadas**

Que presentó

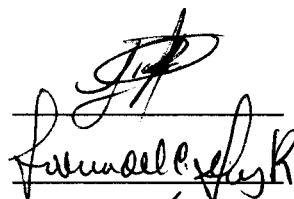
Ing. Itzamná Baqueiro Peña

Directora: Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano



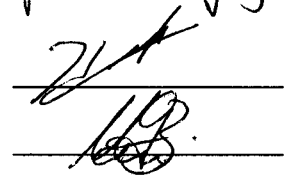
Jurado:

Presidente: Lilia Arely de Jesús Prado Barragán



Secretario: M en C. Lorena del Carmen Gómez Ruíz.

Vocal: Dr. Humberto Hernández Sánchez



Vocal: Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

