



---

---

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**“Determinación de péptidos antihipertensivos, antitrombóticos y bacteriocinas durante la fermentación de leche con *Lb. rhamnosus* GG y *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772”.**

Tesis que presenta:

**I.A. Verenice Torres Salas**

Para obtener el grado de:

**Maestra en Biotecnología**

DIRECTORA

**Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero**

ASESORAS

**Dra. Rina María González Cervantes**

**M.C. Lorena del Carmen Gómez Ruíz**

México, D.F., Diciembre 2014.

Está Tesis fue elaborada en el Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Alma E. Cruz Guerrero (UAM-Iztapalapa) y la asesoría de la Dra. Rina María González Cervantes (UAM-Lerma) y la M.C. Lorena del Carmen Gómez Ruíz (UAM-Iztapalapa). La realización de este trabajo fue posible gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con el No. de Beca 283773.

México, D.F. a 16 de Diciembre de 2014.

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

**Determinación de péptidos antihipertensivos, antitrombóticos y  
bacteriocinas durante la fermentación de leche con *Lb. rhamnosus*  
GG y *Lb. delbrueckii sp. bulgaricus* NCFB 2772**

que presentó

I.A. Verenice Torres Salas

Directora:

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero



---

Jurado:

Dr. José Mariano García Garibay  
(Presidente)



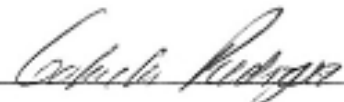
---

Dra. Rina María González Cervantes  
(Secretario)




---

Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano  
(Vocal)



---

M.C. Lorena del Carmen Gómez Ruíz  
(Vocal)



---

## *DEDICATORIAS*

*A Dios.*

*A mis papás Ma. Isabel Salas Medina y Jorge N. Torres Uribe.*

*A mis abuelos: Eustolia y Sidronio †; Carmen† y Timoteo†.*

*A mis hermanos: Isabel y Jorge.*

*A mis amigos.*

*Sonríe siempre y que tu sonrisa sea para todos.*

## *AGRADECIMIENTOS*

*A Dios.*

*A mi familia.*

*A la Universidad Autónoma Metropolitana que por medio de su cuerpo académico y en especial del que labora en el Departamento de Biotecnología Agroalimentaria por contribuir a mi formación investigadora.*

*A la Dra. Alma E. Cruz Guerrero por su dirección, apoyo y disponibilidad para llevar a cabo esta investigación.*

*A la M.C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz por sus recomendaciones y observaciones para mejorar el presente trabajo.*

*A la Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano por sus acertadas sugerencias y observaciones a este trabajo.*

*A la Dra. Rina María González Cervantes por sus comentarios que contribuyeron a la presente investigación.*

*Al Dr. Mariano García Garibay por su apoyo en la revisión de este trabajo.*

*A todos los integrantes de la Planta Piloto II que estuvieron durante mi estancia en el 2012-2014 por su amistad, los buenos momentos, los consejos, recomendaciones, apoyo y ánimo para llevar a buen término la presente investigación.*

*A mis compañeros de maestría por su apoyo durante este camino de formación y desarrollo de nuestra capacidad investigadora.*

*A todos los que de manera indirecta contribuyeron a concluir con éxito esta investigación.*

# **Determinación de péptidos antihipertensivos, antitrombóticos y bacteriocinas durante la fermentación de leche con *Lb. rhamnosus* GG y *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772.**

Torres, S. V.<sup>1</sup>, Cruz, G. A. E.<sup>1</sup>, González, C. R. M.<sup>2</sup>, Gómez, R. L. C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología Alimentaria. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, D.F., México, C. P. 09340. <sup>2</sup>División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Lerma, Av. de las Garzas 10, Col. El Panteón, Lerma de Villada, Lerma, Estado de México, C. P. 52005.

## **RESUMEN**

Los péptidos bioactivos son capaces de ejercer actividades reguladoras en el organismo humano. Estos se encuentran encriptados e inactivos en las proteínas de la leche y una manera de liberarlos es mediante la fermentación de la leche a través del sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas. El objetivo de este trabajo fue determinar los péptidos con actividad biológica (antihipertensiva y antitrombótica) y bacteriocinas producidos durante la fermentación de la leche con *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 y su co-cultivo. La máxima actividad antihipertensiva se obtuvo en el sobrenadante de 24 horas de las tres fermentaciones en un rango de 74.86-79.10%. La actividad antitrombótica encontrada en los sobrenadantes de 24 horas de cada una de las fermentaciones se situó en un rango de 49.49-73.58%. Respecto a la producción de bacteriocinas solo *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 produjo compuestos que inhiben el crecimiento de *E. coli* sp. pero no el de *Listeria innocua* ATCC 33090 y *Micrococcus luteus* CD-BBB1018.

**Palabras clave:** *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772, co-cultivo, antihipertensivo, antitrombótico, bacteriocina.

**Determination of antihypertensive, antithrombotic peptides and bacteriocins during fermentation of milk with *Lb. rhamnosus* GG and *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772.**

Torres, S. V.<sup>1</sup>, Cruz, G. A. E.<sup>1</sup>, González, C. R. M.<sup>2</sup>, Gómez, R. L. C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología Alimentaria. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, D.F., México, C. P. 09340. <sup>2</sup>División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Lerma, Av. de las Garzas 10, Col. El Panteón, Lerma de Villada, Lerma, Estado de México, C. P. 52005.

**ABSTRACT**

Bioactive peptides are able to exert regulatory activities in the human organism. These are encrypted and inactive in milk proteins and one way of releasing them is by milk fermentation through the proteolytic system of lactic acid bacteria. The aim of this research was to determine biologically active peptides (antihypertensive and antithrombotic) and bacteriocins produced during milk fermentation with *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 and co-culture. Maximum antihypertensive activity was obtained at 24 hours of the three fermentations in a range of 74.86-79.10%. Antithrombotic activity found at 24 hour of each fermentation stood at 49.49-73.58% range. Related to the production of bacteriocins, only *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 produced compounds which inhibited the growth of *E. coli* sp. but not that one of *Listeria innocua* ATCC 33090 and *Micrococcus luteus* CD-BBB1018.

**Key words:** *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772, co-culture, antihypertensive, antithrombotic, bacteriocin.

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>2</b>
2.1. Composición proteica de la leche.....	2
2.2. Proteínas lácteas como fuentes de ingredientes funcionales.....	5
2.3. Producción de péptidos bioactivos.....	7
2.4. Actividades biológicas de los péptidos lácteos.....	8
2.4.1. Actividad antihipertensiva.....	9
2.4.2. Actividad antitrombótica.....	15
2.4.3. Actividad antimicrobiana e inmunomoduladora.....	18
2.4.4. Actividad opiácea.....	19
2.4.5. Péptidos acarreadores de minerales.....	20
2.4.6. Otras actividades biológicas.....	21
2.5. Bacteriocinas.....	22
2.5.1. Clasificación.....	24
2.5.2. Modo de acción.....	25
2.6. Bacterias ácido lácticas.....	27
2.6.1. Género <i>Lactobacillus</i> .....	28
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>31</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>32</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
5.1. Objetivo general.....	32
5.2. Objetivos particulares.....	32



<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	33
6.1. Fermentación.....	33
6.2. Cuantificación de microorganismos viables.....	33
6.3. Tratamiento de muestras.....	34
6.4. Determinación de grupos amino libres (TNBS).....	34
6.5. Determinación de la inhibición de la ECA-I.....	36
6.6. Determinación de la inhibición de la formación del coágulo.....	37
6.7. Determinación de la producción de bacteriocinas.....	38
6.8. Cromatografía de exclusión molecular.....	40
<b>7. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	41
<b>8. RESULTADOS</b> .....	42
8.1. Crecimiento de BAL durante la fermentación de leche.....	42
8.2. Determinación de grado de proteólisis por grupos amino libres.....	43
8.3. Determinación de la inhibición de la ECA-I.....	45
8.4. Determinación de la inhibición de la formación del coágulo.....	49
8.5. Determinación de la producción de bacteriocinas.....	51
8.6. Cromatografía de exclusión molecular.....	54
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	61
<b>10. PERSPECTIVAS</b> .....	61
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	63

## ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
<b>Tabla 1</b>	Funciones biológicas de las proteínas de la leche.....	6
<b>Tabla 2</b>	Péptidos inhibidores de la ECA- I generados a partir de proteínas de leche.....	11
<b>Tabla 3</b>	Productos lácteos con péptidos antihipertensivos.....	14
<b>Tabla 4</b>	Diferencias entre bacteriocinas y antibióticos.....	23
<b>Tabla 5</b>	Péptidos potencialmente bioactivos encontrados durante la fermentación de leche con <i>Lb. rhamnosus</i> GG, <i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> NCFB 2772 y su co-cultivo.....	59
<b>Tabla 6.</b>	Péptidos potencialmente bioactivos encontrados en el sobrenadante con 24 horas de fermentación de leche con <i>Lb. rhamnosus</i> GG, <i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> NCFB 2772 y su co-cultivo.....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
<b>Figura 1</b>	Bioactividades de péptidos provenientes de proteínas de la leche, y los sistemas que pueden afectar.....	8
<b>Figura 2</b>	Forma de acción de los péptidos inhibidores de la ECA-I. BRA, Bloqueadores del receptor de angiotensina II; AA, antagonistas de aldosterona.....	10
<b>Figura 3</b>	Modelo de interacción del centro activo de la ECA-I con los sustratos o inhibidores competitivos.....	12
<b>Figura 4</b>	Comparación de la secuencia de aminoácidos de la $\kappa$ -caseína de leche de vaca y el fibrinógeno humano.....	16
<b>Figura 5</b>	Mecanismos de inhibición de la trombina.....	17
<b>Figura 6</b>	Modo de acción de las bacteriocinas. (A) Bacteriocinas clase I; (B) Bacteriocinas clase II y (C) Bacteriolisinas.....	25
<b>Figura 7</b>	Reacción del ácido trinitrobencensulfónico con los grupos amino primarios.....	35
<b>Figura 8</b>	Hidrólisis del sustrato hipuril-L-histidil-L-leucina por la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I) a ácido hipúrico y L-histidil-L-leucina.....	36
<b>Figura 9</b>	Crecimiento de BAL en las fermentaciones individuales y el co-cultivo.....	42
<b>Figura 10</b>	Evolución del pH durante la fermentación con BAL en cultivo individual y el co-cultivo.....	43
<b>Figura 11</b>	Determinación de grupos amino libres en las fermentaciones individuales y el co-cultivo.....	44

<b>Figura 12</b>	Cromatograma que representa el tiempo de elución de ácido hipúrico (15.40 min) y el área generada por una concentración de 0.0285 mM, cuando la ECA-I no es inhibida durante la reacción de ensayo.....	45
<b>Figura 13</b>	Inhibición de la ECA-I por los sobrenadantes de fermentación de <i>Lb. rhamnosus</i> GG, <i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> NCFB 2772, y su co-cultivo.....	46
<b>Figura 14</b>	Actividad específica de los sobrenadantes de fermentación de <i>Lb. rhamnosus</i> GG, <i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> NCFB 2772, y su co-cultivo.....	48
<b>Figura 15</b>	Inhibición de la formación de coágulo (%) por los diferentes sobrenadantes de la fermentación con <i>Lb. rhamnosus</i> GG, <i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> NCFB 2772 y su co-cultivo.....	50
<b>Figura 16</b>	Actividad específica de los sobrenadantes de <i>Lb. rhamnosus</i> GG, <i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> NCFB 2772 y su co-cultivo.....	51
<b>Figura 17</b>	Inhibición del crecimiento <i>E. coli</i> sp. con el sobrenadante de la fermentación de leche con <i>Lb. rhamnosus</i> GG.....	52
<b>Figura 18</b>	Inhibición de <i>E. coli</i> sp. con el sobrenadante de la fermentación de leche con <i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> NCFB 2772.....	53
<b>Figura 19</b>	Inhibición de <i>E. coli</i> sp. con el sobrenadante de la fermentación de leche con el co-cultivo.....	54
<b>Figura 20</b>	Concentración y peso molecular (rango entre paréntesis) de las fracciones obtenidas en el sobrenadante de <i>Lb. rhamnosus</i> GG durante la fermentación.....	55
<b>Figura 21</b>	Concentración y peso molecular (rango entre paréntesis) de las fracciones obtenidas en el sobrenadante de <i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> NCFB 2772 durante la fermentación.....	56
<b>Figura 22</b>	Concentración y peso molecular (rango entre paréntesis) de las fracciones obtenidas en el sobrenadante del co-cultivo durante la fermentación.....	57
<b>Figura 23</b>	Concentración y peso molecular (rango entre paréntesis) de las fracciones obtenidas en el sobrenadante con 24 horas de fermentación.....	58

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años el estudio de los péptidos con actividad biológica ha tenido gran relevancia sobre todo porque estos componentes son capaces de ejercer actividades reguladoras en el organismo humano independientemente de su valor nutricional. Estos péptidos bioactivos necesitan ser liberados, para que su actividad biológica pueda llevarse a cabo, debido a que se encuentran encriptados en las proteínas de la leche. Una manera de obtener las secuencias peptídicas bioactivas es a través del sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas (BAL) durante la fermentación de la leche.

Las BAL tienen un amplio historial de aplicación en productos fermentados por la influencia que ejercen sobre las características nutricionales, organolépticas y antimicrobianas asociadas a la producción de ácidos orgánicos, etanol, compuestos aromáticos, exopolisacáridos, bacteriocinas y péptidos producidos. Estos dos últimos grupos han atraído el interés de los investigadores sobre todo en bacterias probióticas, debido a su potencial en la prevención de enfermedades (generación de péptidos con actividades antihipertensiva y antitrombótica), la conservación, calidad y seguridad de los alimentos. Las bacteriocinas poseen propiedades bactericidas contra miembros de la misma especie o especies relacionadas a la cepa productora e incluso contra cepas distanciadas filogenéticamente (De Vuyst *et al.*, 2007; Dolz, 2008; González-Martínez *et al.*, 2003).

La relevancia que los péptidos bioactivos han obtenido en el mercado, ha llevado al desarrollo de técnicas para la obtención de nuevos péptidos a partir de proteínas alimentarias mediante digestión enzimática *in vitro* o empleando enzimas proteolíticas de origen animal (Meisel *et al.*, 2004).

En este marco, la investigación de las fermentaciones con *Lactobacillus rhamnosus* GG (*Lb. rhamnosus* GG), *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 (*Lb.*

*delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 277) y su co-cultivo, permitirá conocer la funcionalidad de los péptidos bioactivos en especial antihipertensivos, antitrombóticos y bacteriocinas, con la finalidad de obtener beneficios a la salud del consumidor, seguridad y calidad de los productos lácteos.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Composición proteica de la leche**

La leche es la secreción de las glándulas mamarias de los mamíferos, que proporciona nutrientes y protección inmunológica. Está constituida mayoritariamente de agua, que se conforma de una compleja dispersión acuosa debido a que contiene proteínas, lípidos, lactosa y sales minerales (Santos, 1995).

La leche bovina contiene 3.5% de proteína, la cual está constituida por un 80% de caseína y un 20% de proteínas del lactosuero (Korhonen, 2009<sup>a</sup>).

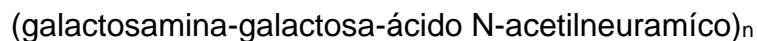
Las caseínas se caracterizan por tener enlaces esteres de fosfatos con la serina y treonina, alto contenido de prolina, leucina y ácido glutámico, poco o nada de residuos de cisteína y baja solubilidad a pH 4-5. Estas proteínas no son susceptibles de desnaturalización térmica (Santos, 1995; Villegas, 2004). Son anfóteras, al pH normal de la leche, están del lado alcalino al de su punto isoeléctrico y en consecuencia, se comportan como ácidos. Este grupo de proteínas está conformado por:  $\alpha$ s1-caseína,  $\alpha$ s2-caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína (Amiot, 1991).

La caseína  $\alpha$ s1 es un polipéptido de 199 residuos de aminoácidos en la leche de vaca, con un peso molecular de 23.6 kDa. Carece de cisteína pero contiene de 8 a 11 fosfatos unidos a serina. Estos grupos fosfato son los responsables de la sensibilidad al ión calcio. A concentraciones de calcio 5-10 mM, la  $\alpha$ s1-caseína forma un precipitado insoluble (Santos, 1995).

Existe un monómero con similar configuración a la  $\alpha_{s1}$ -caseína esta es la  $\alpha_{s2}$ -caseína; tiene un peso molecular de 24.35 kDa con 207 residuos de aminoácidos; es la caseína más hidrofílica. Contiene dos moléculas de cisteína y es sensible al ión calcio a cualquier temperatura, debido a su riqueza en grupos fosfato pero cuando está dentro de la micela es estabilizada por  $\kappa$ -caseína (Santos, 1995; Villegas, 2004).

La segunda proteína más abundante en la leche de vaca es la  $\beta$ -caseína, se encuentra constituida por un solo polipéptido con cinco residuos de fosfoserinas y un peso molecular de 23.983 kDa. Tiene 209 residuos de aminoácidos, pero sin cisteína. A concentraciones normales de calcio en leche e incluso más bajas, es insoluble a temperatura ambiente. Puede ser disociada de la micela a 4 °C (Santos, 1995).

Una de las caseínas que difiere de las anteriores es la  $\kappa$ -caseína, la cual posee un contenido variable y sustancial de carbohidratos (más de 10%) formado por varias secuencias:



Dada esta conformación se dificulta saber su tamaño, forma y configuración. El peso molecular del polímero está entre 88 y 118 kDa, a diferencia del de la cadena polipeptídica que es de solo 19.007 kDa. Esta caseína da estabilidad a la micela debido a que es soluble a diferentes concentraciones de calcio y mantiene solubles a las caseínas sensibles al calcio (Santos, 1995; Villegas, 2004).

El segundo grupo de proteínas está conformado por las del lactosuero, quienes después de precipitar la caseína por ácido (pH 4.6 a 20°C) quedan en solución. Son proteínas termosensibles y se desnaturalizan por calor a temperaturas superiores a las de pasteurización. En el aspecto nutritivo estas proteínas son más ricas que las caseínas en aminoácidos esenciales (lisina, metionina y triptófano). Dentro de este

grupo tenemos a: la  $\beta$ -lactoglobulina, la  $\alpha$ -lactoalbúmina, la seroalbúmina, las globulinas y algunas proteínas menores (Amiot, 1991; Santos, 1995).

La más importante de las proteínas del lactosuero con base a su concentración es la  $\beta$ -lactoglobulina, el peso molecular del monómero es de 18 kDa y presenta una tendencia a formar agregados de hasta 8 monómeros en función del pH al que se encuentre. Constituye alrededor del 50% de las proteínas del suero de leche bovina. Es caracterizada por su solubilidad en una solución diluida de sales neutras y por su baja solubilidad en agua pura, debido al contenido de residuos azufrados que le permiten formar puentes disulfuro intramoleculares para su estabilización (Amiot, 1991, Korhonen, 2009<sup>a</sup>; Villegas, 2004).

La  $\alpha$ -lactoalbúmina representa el 23% de las proteínas del lactosuero, una cantidad aproximada de 0.7 g/L en leche de vaca. Su peso molecular es de 16 kDa y contiene ácido glutámico y leucina en posiciones terminales. Es importante a nivel estructural y enzimático, ya que interviene en la síntesis de lactosa y cuenta con cuatro puentes disulfuro (Amiot, 1991; Villegas, 2004). Es una fuente de aminoácidos esenciales como triptófano y cisteína los cuales son precursores de serotonina y glutatión, respectivamente (Korhonen, 2009<sup>a</sup>).

De este grupo de proteínas del lactosuero forma parte la seroalbúmina cuyo peso molecular es 65 kDa, contiene 582 residuos de aminoácidos y su punto isoeléctrico es de 4.7. Es rica en lisina y cisteína, en posiciones terminales posee ácido aspártico y alanina (Amiot, 1991; Santos, 1995).

Respecto a las globulinas, estas se caracterizan por tener un elevado peso molecular (180 kDa) y por tener carbohidratos. Son menos solubles en agua que las lactoalbúminas y precipitan en una solución semisaturada de sulfato de amonio. Dentro de este grupo es importante destacar a las inmunoglobulinas (tipo IgG1) por sus

propiedades inmunológicas, se cree que contribuye al sistema antibiótico de la leche cruda (Amiot, 1991).

La lactoferrina (LF) es una glicoproteína cuyo peso molecular es de 80kDa, pertenece a la familia de las proteínas ligadoras de hierro, denominadas transferrinas, es producida por las células epiteliales de las mucosas de los mamíferos, encontrándose en secreciones como el calostro, la leche, las lágrimas, la saliva, los fluidos seminales y vaginales. Sin embargo, es en la leche y particularmente en su calostro, donde se encuentra en mayor concentración (7 g/L en calostro humano) (Rodríguez-Franco *et al.*, 2005).

La LF es un componente abundante de los neutrófilos y puede ser liberada al plasma sanguíneo por la acción de éstos. Se le confieren muchas actividades biológicas como: antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena, propiedades de inmunoregulación y el transporte de metales (Rodríguez-Franco *et al.*, 2005). Se considera que juega un papel importante en el sistema innato de defensa contra infecciones microbianas y procesos degenerativos, por ejemplo con los radicales libres de oxígeno. Las lactoferrinas humana y bovina, despliegan un amplio espectro antimicrobiano, actuando contra bacterias gram positivas, gram negativas, contra algunos virus y hongos (Korhonen, 2009<sup>a</sup>; Rodríguez-Franco *et al.*, 2005).

Otras proteínas menores que se encuentran en la leche son las asociadas a la superficie de los glóbulos de grasa constituidas por euglobulina, fosfatasa alcalina y xantín-oxidasa, además de mucoproteína, lipoproteína y lactolina (Amiot, 1991; Villegas, 2004).

## **2.2. Proteínas lácteas como fuentes de ingredientes funcionales**

Las proteínas intactas de la leche presentan gran variedad de actividades biológicas como se muestra en la tabla 1. También contienen péptidos bioactivos o



funcionales codificados dentro de la estructura primaria, estos son secuencias de aminoácidos inactivos (de 2 a 20 aminoácidos) en el interior de la proteína precursora, que ejercen ciertas actividades biológicas tras su liberación mediante hidrólisis enzimática o química ejerciendo su efecto sobre los sistemas cardiovascular, inmunológico, digestivo y nervioso (Beshkova *et al.*, 2012; Mulero *et al.*, 2011).

**Tabla 1.** Funciones biológicas de las proteínas de la leche.

<b>Proteína</b>	<b>Función</b>
<b>Caseínas</b> ( $\alpha$ S1, $\alpha$ S2, $\beta$ y $\kappa$ )	Transporte de minerales y elementos traza (Ca, PO <sub>4</sub> , Fe, Zn y Cu), precursor de péptidos bioactivos con actividad inmunomoduladora, anticancerígena y ligadora de ácidos grasos.
<b><math>\beta</math>-lactoglobulina</b>	Transporte de vitaminas (retinol), antiviral, precursor de péptidos bioactivos, antioxidante, anticancerígeno, ligador de ácidos grasos y efecto hipercolesterolémico.
<b><math>\alpha</math>-lactoalbúmina</b>	Transporte de calcio, inmunomodulador, anticancerígeno, precursor de péptidos bioactivos y efector de la síntesis de lactosa en glándulas mamarias.
<b>Inmunoglobulinas G, M y A</b>	Protección inmune específica (anticuerpos y sistemas complementarios), potencial precursor de péptidos bioactivos.
<b>Glicomacropéptido</b>	Antiviral, antimicrobiano, antitrombótico, bifidogénico y regulación de hormonas gástricas.
<b>Lactoferrina</b>	Antimicrobiano, antioxidante, anticancerígeno, antiinflamatorio, inmunomodulador, transportador de Fe, regulador de crecimiento celular, precursor de péptidos bioactivos y estimulación de proliferación de osteoblastos.
<b>Lactoperoxidasa</b>	Sistema antimicrobiano asociado al tiocianato y peróxido de hidrógeno, efecto sinérgico con inmunoglobulinas, lactoferrina y lisozima.

<b>Lizosima</b>	Antimicrobiano, efecto sinérgico con inmunoglobulinas, lactoferrina y lactoperoxidasa.
<b>Seroalbúmina</b>	Antimutagénico, anticancerígeno, inmunomodulador y precursor de péptidos bioactivos

Fuente: Modificado de Korhonen, 2009<sup>a</sup>; Madureira *et al.*, 2007; Spadoti, 2005.

### 2.3. Producción de péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos se definen como fragmentos específicos de proteínas capaces de ejercer una actividad reguladora en el organismo humano independiente de su valor nutricional. El tamaño de las secuencias activas puede variar de 2 a 20 residuos de aminoácidos y su actividad se basa en la composición inherente de esas secuencias de aminoácidos (Korhonen, 2009<sup>b</sup>; Spadoti *et al.*, 2005).

Esos péptidos pueden ser obtenidos a través de diferentes vías como: hidrólisis por enzimas digestivas (pepsina, tripsina, quimotripsina o pancreatina), proteólisis generada por bacterias ácido lácticas o por hidrólisis provocada por enzimas derivadas de microorganismos y plantas. Aunque hay estudios donde se ha demostrado que una combinación de estos métodos es efectiva en la generación de péptidos funcionales. (Korhonen, 2009<sup>b</sup>).

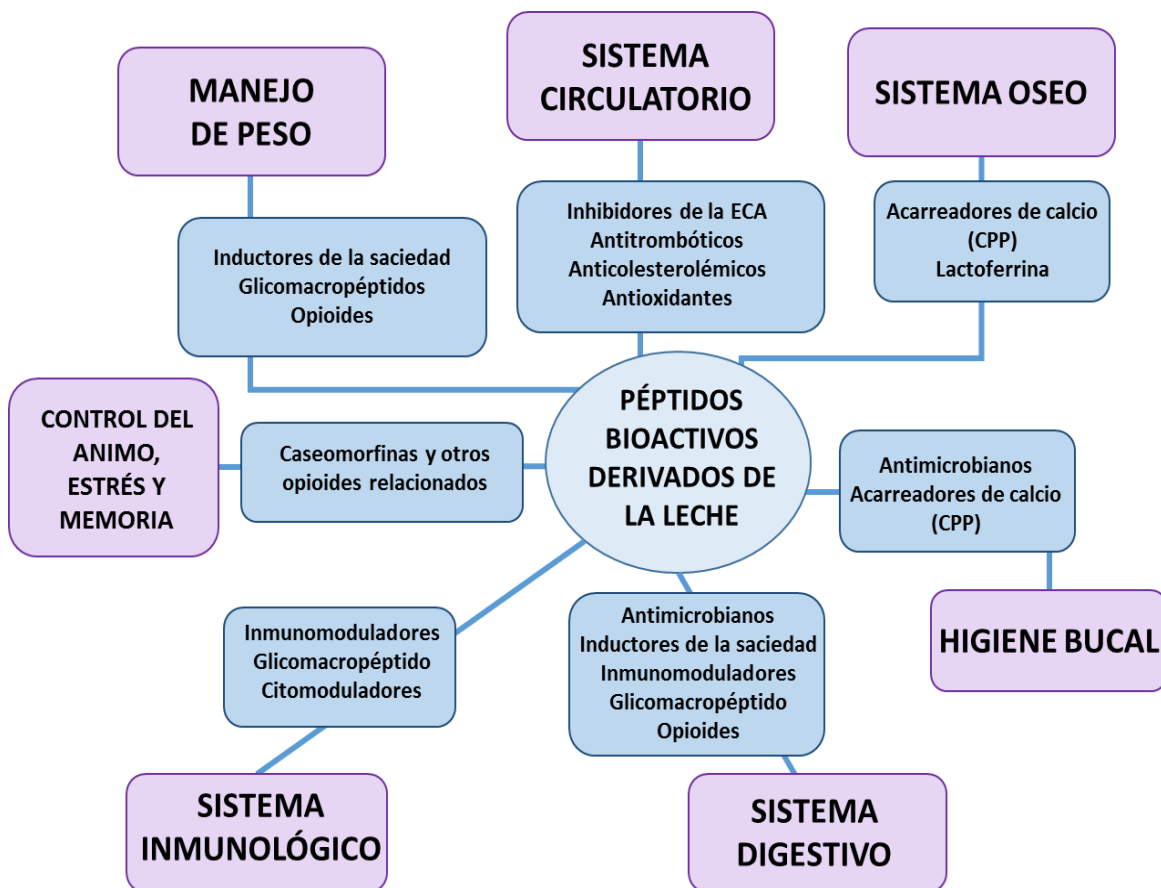
Una fuente importante de estos péptidos son las proteínas de la leche, especialmente la caseína. La liberación de esos péptidos se puede dar mediante la proteólisis microbiana gracias a BAL, las cuales poseen un amplio espectro de enzimas proteolíticas incluyendo endopeptidasas, aminopeptidasas, tripeptidasas y peptidasas. El óptimo crecimiento de las BAL a partir de caseína es debido a que presentan la habilidad de degradarla a oligopéptidos ricos en prolina (Muro, 2011).

Rodríguez-Figueroa (2012) sugiere que la proteólisis puede ser un prerrequisito para generar actividad inhibitoria de la ECA-I (Enzima Convertidora de Angiotensina-

l), sin embargo parece que el sistema proteolítico de cepas de *Lactococcus lactis* determina la secuencia de péptidos asociados a la inhibición de la ECA-I.

## 2.4. Actividades biológicas de los péptidos lácteos

Los péptidos bioactivos derivados de la leche pueden funcionar como sustancias reguladoras exógenas, de manera similar a una hormona sobre diferentes sitios periféricos y del intestino de mamíferos (Gobbetti, 2000). La caracterización de secuencias incluye péptidos con actividad antihipertensiva, antitrombótica, antimicrobiana, antioxidante, inmunomoduladora y opioide (ver figura 1) (Korhonen, 2009<sup>b</sup>).



**Fig.1.** Bioactividades de péptidos provenientes de proteínas de la leche, y los sistemas que pueden afectar (Korhonen, 2009<sup>b</sup>).

### 2.4.1. Actividad antihipertensiva

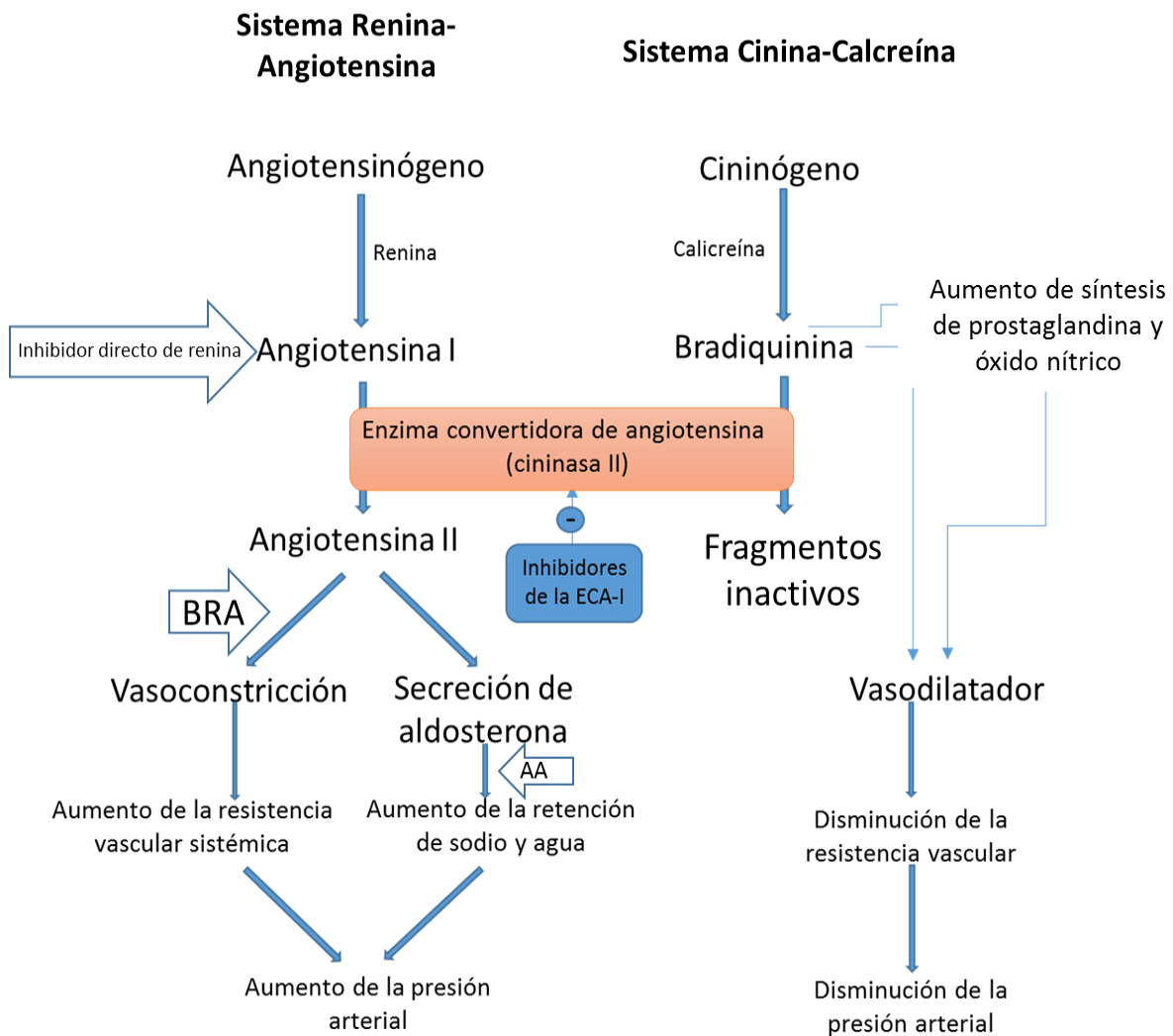
El mecanismo más estudiado como actividad de los péptidos antihipertensivos es la inhibición de la actividad de la ECA-I.

La ECA-I es una peptidil-dipéptido hidrolasa (EC. 3.4.15.1), exopeptidasa que separa dipéptidos del lado C-terminal de varios oligopéptidos, se localiza en diferentes tejidos (plasma, pulmón, riñón, corazón, músculo-esquelético, páncreas y cerebro) (Beshkova *et al.*, 2012; FitzGerald *et al.*, 2004). Cataliza la conversión de la angiotensina I (decapéptido) en angiotensina II (octapéptido). Su acción provoca la contracción rápida de las arteriolas y, por consiguiente, el incremento de la presión arterial, por la estimulación de la producción de aldosterona por las glándulas suprarrenales, hormona que induce la excreción de potasio y la retención de sodio y agua, lo que provoca el incremento del volumen extracelular, y la neutralización de la producción de renina. Esta última, libera el decapeptido angiotensina I del sistema renina angiotensina.

La ECA-I actúa simultáneamente en el sistema cinina-caliceína catalizando la degradación de las bradiquininas (compuestos de potente acción vasodilatadora), favoreciendo el incremento de la presión arterial.

Un incremento de la disponibilidad de bradiquininas puede ser el responsable del efecto beneficioso de la inhibición de la ECA-I sobre la presión sanguínea (Ondetti *et al.*, 1982; Mulero, 2011).

En la figura 2 se observa cómo funcionan los sistemas renina-angiotensina y cinina-caliceína, y la actividad de los péptidos inhibidores de la ECA-I.



**Fig. 2.** Forma de acción de los péptidos inhibidores de la ECA-I. BRA, bloqueadores del receptor de angiotensina II; AA, antagonistas de aldosterona (Hayes *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2004; Phelan *et al.*, 2011).

Maruyama *et al.* (1982) fueron los primeros en aislar un péptido inhibidor de la ECA-I llamado CEI 12 a partir de un hidrolizado de caseína.

Yamamoto *et al.* (1994) han demostrado que las leches fermentadas con *L. helveticus* son las que presentan más actividad inhibidora de la ECA-I. Otros péptidos con actividades inhibidoras se han identificado en leches fermentadas por

*Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* sp. *cremoris* y en el kéfir, entre otros.

Usualmente los péptidos inhibidores de la ECA-I contienen de 2-12 aminoácidos, aunque se han reportado péptidos activos por arriba de 27 aminoácidos (Robert *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 1994). En la tabla 2 se muestran algunos péptidos inhibidores de la ECA-I.

**Tabla 2.** Péptidos inhibidores de la ECA-I generados a partir de proteínas de leche.

Fragmento	Secuencia	Origen
$\kappa$ -CN f(108-110) $\beta$ -CN f(84-86) $\beta$ -CN f(74-76)	IPP VPP IPP	Fermentación
$\beta$ -CN f (6-14) $\beta$ -CN f(73-82) $\beta$ CN f(7-14)	LNVPGEIVE NIPPLTQTPV NVPGEIVE	Leche fermentada
$\alpha$ -lactoglobulina f (102-105)	YLLF	Sintético
$\alpha$ -lactoalbúmina f (50-53) $\alpha$ -lactoalbúmina f (50-51), f (18-19)	YGLF YG	Sintético
$\kappa$ -CN (58-59)	YP	Fermentación y sintético
$\beta$ -CN f(193-198) $\beta$ -CN f(108-113) $\alpha$ s1-CN f(157-164) $\alpha$ s1-CN f(142-147)	YQQPVL EMPFPK DAYPSGAW LAYFYP	Fermentación
$\beta$ -CN f(58-76)	LVYFPFGPIPNLSP QNIPP	<i>Lactobacillus helveticus</i> PR4

---

$\beta$ -CN f(57-64)

SLVLPVPE

*Lactobacillus  
helveticus* CP790

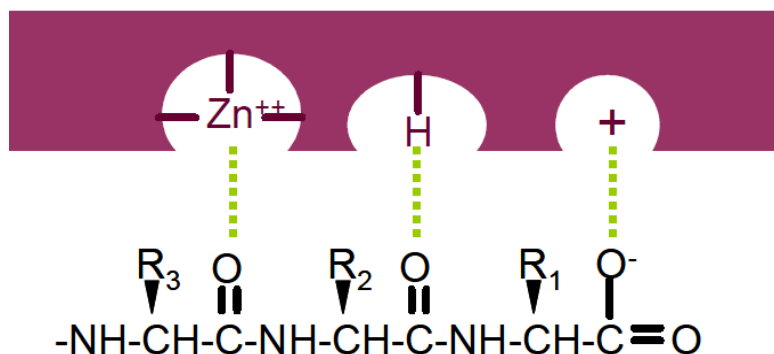
---

Fuente: Modificado de Gobbetti *et al.*, 2004.

La ECA-I parece preferir sustratos o inhibidores competitivos que contienen residuos de aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos –triptófano, tirosina, fenilalanina- o cadena ramificada) en cada una de las tres posiciones C-terminal (ver figura 3) (Cheung *et al.*, 1980; Saito *et al.*, 1994; Vermeirssen *et al.*, 2004). Sin embargo se ha postulado que el mecanismo de inhibición de la ECA-I puede darse mediante la interacción de un enlace aniónico en sitios distintos a la región catalítica del sitio activo originando un tipo de inhibición alostérica (FitzGerald *et al.*, 2000).

Muchos péptidos inhibidores de la ECA-I indican una correlación entre su estructura y actividad, los residuos de C-terminal juegan un papel predominante en la unión competitiva al sitio activo de la ECA-I.

Entre los aminoácidos más favorables con C-terminal se encuentran los aromáticos, así como el ácido imino prolina, mientras que la ECA-I se une débilmente a péptidos que tienen aminoácidos terminales dicarboxílicos (Hernández- Ledesma, 2011).



**Fig. 3.** Modelo de interacción del centro activo de la ECA-I con los sustratos o inhibidores competitivos (Quirós, 2007).

En el efecto antihipertensivo de los péptidos inhibidores de la ECA-I influye la biodisponibilidad, la cual esta predominantemente determinada por la resistencia a la degradación por peptidasas y la absorción gastrointestinal. Cabe destacar que, la prolina es un aminoácido resistente a la degradación por enzimas digestivas y puede pasar desde el intestino delgado dentro del torrente sanguíneo en secuencia de péptidos de cadena corta (Vermeirssen *et al.*, 2004). La mayoría de los péptidos inhibidores de ECA-I derivados de caseína (casoquininas) y suero de leche (lactoquininas) son relativamente de baja masa molecular, cadena corta y contienen prolina en su estructura. Algunos ejemplos son: IP, VPP, LPP y YP (Cheung *et al.*, 1980; Jäkälä *et al.*, 2010; Muro, 2011).

El potencial inhibitorio de péptidos como las casoquininas que además de prolina poseen lisina o arginina en el residuo C-terminal, se encuentra asociado a la carga positiva del grupo guanidino o del grupo  $\epsilon$ -amino de la posición C-terminal de la arginina o lisina, respectivamente (Cheung *et al.*, 1980; FitzGerald *et al.*, 2000).

Las BAL son capaces de producir inhibidores de la ECA-I en diversas cantidades durante el proceso de fermentación de leche. Los inhibidores son formados por la proteínasa bacteriana cuando la bacteria láctica hidroliza las proteínas de la leche, principalmente caseína, en péptidos, los cuales pueden ser utilizados como fuentes de nitrógeno necesarias para el crecimiento de la bacteria. La proteólisis (actividad proteolítica total y específica) juega un papel importante dado que los inhibidores son péptidos (Pihlanto *et al.*, 2010).

Pihlanto *et al.* (2010) señalan que una fuerte actividad proteolítica está relacionada con la habilidad de ciertas cepas para producir un efecto inhibitorio de la ECA-I, dado que al fermentar leche con cepas de *Lactococcus lactis* encontraron una baja actividad proteolítica y un efecto no inhibitorio de la ECA-I, mientras que al fermentar la leche con cepas de *Lactobacillus* encontraron efecto inhibitorio.



Gobbetti *et al.* (2000) encontraron que las fracciones de péptidos con alta actividad inhibitoria de la ECA-I en leche fermentada con *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* SS1 provenían de la secuencia de  $\beta$ -caseína.

En la tabla 3 se muestran productos comerciales que contienen péptidos con actividad antihipertensiva.

**Tabla 3.** Productos lácteos con péptidos antihipertensivos.

Producto	Compañía	Descripción del producto	Secuencia del péptido
<b>Calpis®</b>	Calpis Co., Japón	Bebida de leche fermentada que contiene tripéptidos obtenidos por el fraccionamiento de $\beta$ y $\kappa$ -caseína usando <i>Lactobacillus helveticus</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	VPP IPP
<b>Evolus®</b>	Valio, Finlandia	Bebida de leche fermentada que contiene tripéptidos obtenidos por el fraccionamiento de $\beta$ y $\kappa$ -caseína usando <i>Lactobacillus helveticus</i> LBK-1611	VPP IPP
<b>Danaten®</b>	Danone, Francia	Leche fermentada con <i>Lactobacillus helveticus</i> DN-119095	ND
<b>BioZate®</b>	Davisco, EUA	Hidrolizado de proteínas de suero de leche ( $\beta$ -lactoglobulina)	ND
<b>C<sup>12</sup>peptide®</b>	DMV International, Holanda	Hidrolizado de proteína de leche de vaca con un correspondiente fraccionamiento de péptido 23-34 de una proteína de $\alpha$ s1-caseína	FFVAPFPQVFGK

<b>Ameal S®</b>	Calpis, Co., Japón	Bebida de leche fermentada sin grasa que contienen tripéptidos obtenidos por fraccionamiento de $\beta$ - $\kappa$ -caseína usando <i>Lactobacillus helveticus</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	VPP IPP
<b>Casein DP®</b>	Kanebo Ltd., Japón	Péptidos a partir de un hidrolizado de caseína enriquecida en fracción peptídica 23-34 de la proteína $\alpha$ S <sub>1</sub> -caseína	FFVAPFPEZFGK

Nota: ND-No descrito  
Fuente: Ricci *et al.*, 2010

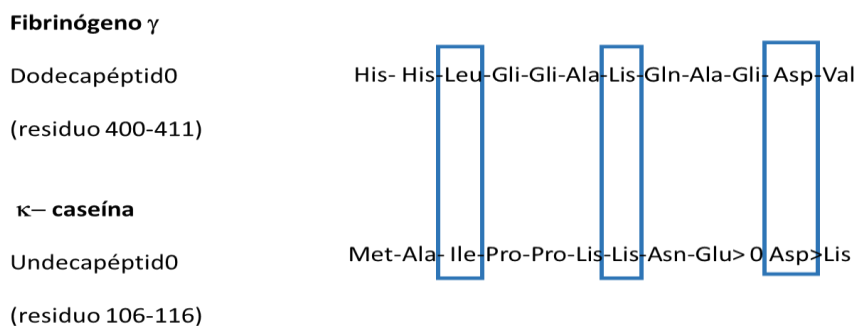
#### 2.4.2. Actividad antitrombótica

La hemostasia es un proceso fisiológico que mantiene la sangre en estado líquido, mientras que induce la formación de un tapón plaquetario en los sitios donde hay lesión vascular, una alteración en este proceso llevará a la formación de trombos. La trombosis es una activación inapropiada de la coagulación de la sangre en un vaso no lesionado o la oclusión trombótica de un vaso después de una lesión relativamente menor. La formación del trombo está predispuesta por la lesión endotelial, la estasis o turbulencia del flujo sanguíneo y la hipercoagulabilidad de la sangre (triada de Virchow) (Montero, 2010). Dentro de estos procesos actúa la trombina, una serina proteasa dimérica que cataliza la conversión de fibrinógeno a fibrina en tres pasos reversibles. En el primero, la trombina está involucrada en una pequeña proteólisis donde se liberan fibrinopéptidos a partir de fibrinógeno para obtener monómeros de fibrina. En el segundo paso, los monómeros de fibrina forman polímeros intermedios a través de interacciones no covalentes. Posteriormente, en el último paso los polímeros intermedios se agregan para formar el coágulo de fibrina (Scheraga, 2004).

Con base en lo anterior, existen péptidos encriptados dentro de la secuencia de glicomacropéptido que son liberados a través del corte de  $\kappa$ -caseína por la renina y tienen la capacidad de inhibir la agregación plaquetaria y la unión del fibrinógeno (cadena- $\gamma$ ) a los receptores plaquetarios de la superficie para evitar la formación de trombos (Hartmann *et al.*, 2007).

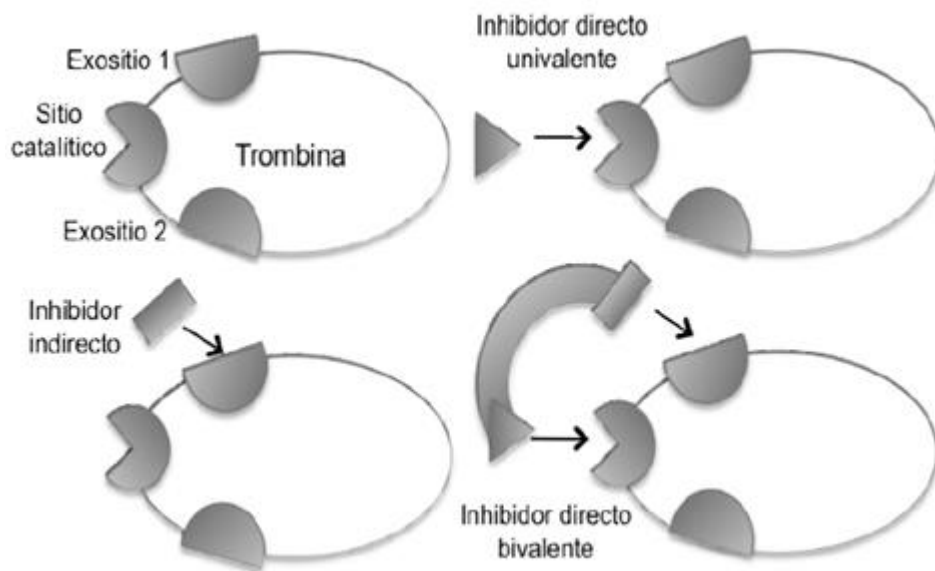
La inhibición de la agregación plaquetaria puede estar relacionada con que a nivel molecular, existen similitudes entre la coagulación de la leche y la de la sangre. En la leche se da la interacción  $\kappa$ -caseína y quimosina, mientras que el proceso de coagulación en la sangre se da por la interacción del fibrinógeno y trombina (Jollés *et al.*, 1991; Mulero *et al.*, 2011).

La región de interacción de la cadena  $\gamma$  de fibrinógeno humano en la agregación plaquetaria es la secuencia C-terminal del dodecapéptido (residuos 400-411) que en sí, posee efectos inhibitorios similares a los de los fragmentos típicos de  $\kappa$ -caseína. Tres residuos de aminoácidos (Ile<sup>108</sup>, Lis<sup>112</sup>, Asp<sup>115</sup>) del citado undecapéptido de  $\kappa$ -caseína (residuos 106-116), están en efecto, en posiciones homólogas comparados con la cadena  $\gamma$  del fibrinógeno (Jollés *et al.*, 1986). Estos residuos parecen ser importantes para el efecto inhibitorio, el cual se produce debido a la competencia entre los péptidos antitrombóticos y los receptores plaquetarios de la cadena  $\gamma$  (ver figura (Jollés *et al.*, 1978; Meisel, 1997).



**Fig. 4** Comparación de la secuencia de aminoácidos de la  $\kappa$ -caseína de leche de vaca y el fibrinógeno humano (Jollés *et al.*, 1986).

Los mecanismos de los péptidos inhibidores de la trombina son variados. La trombina ofrece tres sitios de unión (ver figura 5), los inhibidores directos se unen a la trombina y bloquean su interacción con sus sustratos. Los inhibidores directos bivalentes como la lepirudina y la bivalirudina inhiben tanto el sitio catalítico, como una zona externa. Los inhibidores univalentes directos como el argatrobán y el dabigatrán inhiben sólo el sitio catalítico. Los inhibidores directos bloquean a la trombina libre o unida a la fibrina, de forma igual. Los inhibidores indirectos solo bloquean los exositios (Rojas-Ronquillo, 2012).



**Fig. 5.** Mecanismos de inhibición de la trombina (Rojas-Ronquillo, 2012).

Algunos de los péptidos que presentan actividad antitrombótica son LSFMAIPPK y MAIPPKKNQDK (residuos 106-116). Este último undecapéptido inhibe la agregación plaquetaria inducida por ADP (adenosin difosfato) y la unión de la cadena  $\gamma$  del fibrinógeno humano a su receptor en la superficie de la plaqueta, por lo que se le denomina casoplatelina. Los dos pequeños fragmentos de este péptido MAIPPKK (residuos 106-112) y NQDK (residuos 113-116), así como el caseinoglicopéptido (residuos 106-169) que contiene al undecapéptido pueden afectar la función de las

plaquetas pero tienen menor actividad inhibitoria que el fragmento en sí (Chabance *et al.*, 1995; Fiat *et al.*, 1993; Jollés *et al.*, 1986).

A nivel comercial se ha reportado a BioPURE-GMP (Davisco, EUA), un hidrolizado de proteína de suero cuya bioactividad es debida al glicomacropéptido proveniente de la  $\kappa$ -caseína (106-169) y se le atribuyen actividades antitrombótica, antimicrobiana y anticariogénica (Hartmann *et al.* 2007, Korhonen, 2009<sup>b</sup>).

### **2.4.3. Actividad antimicrobiana e inmunomoduladora**

Los péptidos con estas actividades biológicas y provenientes de la leche son los más estudiados. Los péptidos inmunomoduladores son liberados de las proteínas que los contienen de manera natural durante el proceso de la digestión en el tracto gastrointestinal, lo que afecta la respuesta inmunológica y la función celular en el mismo (Mulero *et al.*, 2011). Son obtenidos a partir de  $\alpha$ s1-caseína ( $\alpha$ s1-CN),  $\beta$ -caseína ( $\beta$ -CN) y  $\alpha$ -lactoalbúmina, estimulan actividades fagocíticas de murino y macrófagos humanos, protegen contra infecciones de *Klebsiella pneumoniae* en ratones. Dependiendo de su concentración, la  $\beta$ -casoquinina y  $\beta$ -casomorfina muestran supresión y estimulación de proliferación de linfocitos (Gobbetti *et al.*, 2002). A nivel comercial un producto con capacidad inmunomoduladora es el Glutamin peptide (DMW, Países bajos), un hidrolizado de proteína de leche en polvo que contiene péptidos ricos en glutamina (Hartmann *et al.*, 2007).

Los efectos producidos por péptidos antimicrobianos parecen estar relacionados con su carga neta positiva, se organizan estructuralmente provocando la formación de canales iónicos en la membrana de los microorganismos propiciando la muerte celular.

Se pueden identificar tres mecanismos de actividad antimicrobiana:

- Secuestrando el hierro e impidiendo su utilización por las bacterias.

- Produciendo alteraciones en la pared bacteriana.
- Mediante la estimulación de la fagocitosis por macrófagos y monocitos.

La actividad antimicrobiana también está relacionada con la interacción de los componentes intracelulares aniónicos como el ADN y ARN, inhibiendo la síntesis de proteínas y la división celular de los microorganismos. Algunos de estos péptidos están relacionados con la activación autolítica en ciertos microorganismos (Mulero, 2011).

Los péptidos antimicrobianos actúan contra diferentes bacterias gram positivas y negativas (*Escherichia*, *Helicobacter*, *Listeria*, *Salmonella* y *Staphylococcus*), levaduras y hongos filamentosos (Hartmann *et al.*, 2007).

#### **2.4.4. Actividad opiácea**

Los péptidos que inducen esta actividad son conocidos como endógenos y son llamados encefalinas, endorfinas y dinorfinas, los cuales interactúan con receptores opioides. Sus efectos dependen del tipo de receptor: los receptores *m* están vinculados a la motilidad intestinal y al comportamiento emocional, los receptores *d* asociados, al comportamiento emocional y los *k* están relacionados con la analgesia y la saciedad (Torres-Llenez *et al.*, 2005).

Las  $\alpha$  y  $\beta$  casomorfina y lactorfinas actúan como opioides agonistas, mientras que las casoxinas actúan como opioides antagonistas. Las casomorfina pueden producir analgesia, modulan el comportamiento social, influyen en el metabolismo postprandial por la estimulación de secreción de insulina y somatostatina, e influyen en la absorción de nutrientes por prolongación del tiempo de tránsito gastrointestinal y ejercen un efecto antidiarréico (Gobbetti *et al.*, 2002).

La característica estructural común entre péptidos opioides endógenos y exógenos, es la presencia de un residuo de tirosina en el grupo amino terminal (excepto los

derivados de  $\alpha$ -caseína ( $\alpha$ -CN)) y la presencia de otro residuo aromático (fenilalanina o tirosina), en la tercera o cuarta posición. El potencial negativo, localizado en los alrededores del grupo hidroxil fenólico de tirosina, es esencial para la actividad opioide, su ausencia causa la pérdida de actividad (Beshkova *et al.*, 2012).

La actividad agonista es comparable con los ligandos endógenos, mientras que los péptidos antagonistas ejercen efectos inhibidores similares a la naloxona, un potente receptor opiáceo antagonista aplicado como droga en el caso de sobredosis de heroína (Muro *et al.*, 2011).

#### **2.4.5. Péptidos acarreadores de minerales**

Las caseínas (CN) de la leche se estabilizan mediante “puentes” con iones fosfato y calcio que conducen a la formación de micelas. A partir de la hidrólisis de las caseínas se forman los caseinofosfopéptidos (CPPs) con uno o más radicales de fosfato ligado a serina. Tienen la función de ligar y transportar minerales como: calcio, fósforo, magnesio y hierro, facilitando, inclusive su absorción y fijación a varios tejidos (Spadoti, 2005). Se han identificado diferentes fosfopéptidos derivados de la caseína que contienen la secuencia SPSPEE. Estos CPPs son liberados por proteólisis, la presencia de múltiples residuos de fosfato los convierten en buenos agentes quelantes de calcio, propiciando por ejemplo, la absorción de este ión en el intestino delgado y la remineralización del esmalte de los dientes cuando está presente en la cavidad oral (Beshkova *et al.*, 2012; Torres-Llanez, 2005).

Figuroa-Hernández *et al.* (2012) encontraron que durante la fermentación con *Lactococcus lactis* sp. *cremoris* NCFB 712 se generaron secuencias peptídicas que tienen la capacidad de fijar hierro y calcio, incrementándose esta actividad en las fermentaciones donde se estableció un control del pH. También determinaron que existe una correlación entre la actividad proteolítica y el calcio y hierro fijados, la más alta se observó en las fermentaciones con pH controlado.

Algunos productos comerciales asociados con una actividad ligadora de minerales son: Capolac (caseinofosfopéptidos, Arla Foods Ingredients, Suecia), Tekkotsu Inryou (caseinofosfopéptido, Suntory, Japón) y Kotsu, Kotsu calcium, (caseinofosfopéptido, Asahi, Japón) (Hartmann *et al.*, 2007).

#### **2.4.6. Otras actividades biológicas**

Existen otras actividades de los péptidos bioactivos como la antioxidante en la cual el péptido actúa impidiendo que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar interactúan más rápido con los radicales libres que con el resto de las moléculas presentes en un determinado microambiente de membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular (Venéreo, 2002). Muchos estudios hacen evidente que los radicales libres juegan un papel importante en el envejecimiento y una variedad de enfermedades. La capacidad antioxidante podría estar implicada en el rescate de los radicales libres o en la prevención del daño por oxidación asociada a la interrupción de la reacción en cadena de un radical libre en la peroxidación de lípidos (Qian *et al.*, 2011).

A partir de leche fermentada con *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus*, Kudoh *et al.* (2001) aislaron un péptido con capacidad antioxidante con la siguiente secuencia de aminoácidos: ARHPHLSFM, que pertenecía al fragmento (96-116) de  $\kappa$ -caseína.

Otro efecto asociado a los péptidos es la actividad antihipercolesterolemia atribuida a dos acciones: inhibición de la absorción del colesterol, posiblemente debido a la represión de la solubilidad micelar del colesterol, y a la regulación del alza de los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL), que están crónicamente suprimidos por la hipercolesterolemia o administración de colesterol en la dieta (Mulero *et al.*, 2011).



## 2.5. Bacteriocinas

La actividad antimicrobiana en productos lácteos fermentados por BAL se debe principalmente a la producción de ácidos orgánicos, pero también a otros compuestos tales como péptidos antifúngicos y bacteriocinas (De Vuyst *et al.*, 2007).

La comunidad científica ha adoptado la definición de bacteriocinas de Klaenhammer's, la cual las define como un grupo heterogéneo de péptidos sintetizados ribosomalmente con actividad antimicrobiana, es decir, muestran propiedades bactericidas contra miembros de la misma especie o especies relacionadas a la cepa productora e incluso contra cepas distanciadas filogenéticamente. Pueden ser producidas por bacterias gram positivas (+) o gram negativas (-) (Beshkova *et al.*, 2012; Dolz, 2008).

En 1925, fue publicada la primera información sobre bacteriocinas, en la investigación se encontró una sustancia de actividad biológica producida por *Escherichia coli* V que tenía una aparente actividad antagónica contra cepas de *E. coli* F (Beshkova *et al.*, 2012).

Se piensa que el 99% de todas las bacterias pueden producir cuando menos una bacteriocina y pocas han sido aisladas, aunque en los últimos años el aumento de la resistencia bacteriana a antibióticos ha hecho necesaria la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos naturales, como son las bacteriocinas (González-Martínez, 2003). Las bacteriocinas con mayor actividad son producidas durante la mitad de la fase exponencial o al inicio de la fase estacionaria (Beshkova *et al.*, 2012).

Uno de los grupos de microorganismos usados con este fin es *Lactobacillus* debido a que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas en diferentes ecosistemas ya que producen sustancias antimicrobianas tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Muro *et al.*, 2011).

Tambekar *et al.* (2010) reportaron que cepas de *Lactobacillus* son capaces de producir bacteriocinas con un espectro amplio contra patógenos; con una estabilidad al calor de 60-90 °C por 10 minutos, estable en un rango de pH ácido o neutro, e inactivas a pH 9.

Las bacteriocinas producidas por BAL ofrecen varias propiedades deseables que las hacen adecuadas para la conservación de alimentos: i) son reconocidas como sustancias seguras, ii) no son activas ni tóxicas sobre células eucarióticas, iii) son inactivadas por enzimas digestivas, iv) son usualmente estables al pH y el calor, v) tienen un amplio espectro antimicrobiano contra patógenos transmitidos por alimentos, así como bacterias asociadas a la descomposición, vi) muestran un modo de acción bactericida, usualmente actúan sobre la membrana citoplasmática, sin resistencia cruzada con antibióticos, y vii) sus determinantes genéticos son usualmente plásmido genéticos, que facilita la manipulación genética (Gálvez *et al.*, 2007). Otra característica de las bacteriocinas son sus diferencias respecto a los antibióticos (ver tabla 4).

**Tabla 4.** Diferencias entre bacteriocinas y antibióticos.

<b>Característica</b>	<b>Bacteriocinas</b>	<b>Antibióticos</b>
<b>Aplicación</b>	Alimentos	Clínica
<b>Síntesis</b>	Ribosomal	Metabolito secundario
<b>Actividad</b>	Espectro amplio	Espectro variado
<b>Inmunidad celular del huésped</b>	Sí	No
<b>Mecanismo de resistencia o tolerancia de la célula diana</b>	Generalmente la adaptación afecta la composición de la membrana celular	Generalmente un determinante genético transferible afecta a diferentes sitios según el modo de acción
<b>Requisitos de interacción</b>	A veces moléculas ancla	Objetivo específico

<b>Modo de acción</b>	Sobre todo la formación de poros, pero en algunos casos posiblemente biosíntesis de la pared celular	Membrana celular u objetivos intracelulares
<b>Toxicidad/efectos secundarios</b>	Ninguno conocido	Sí

Fuente: modificado de Cleveland *et al.*, 2001.

### 2.5.1. Clasificación

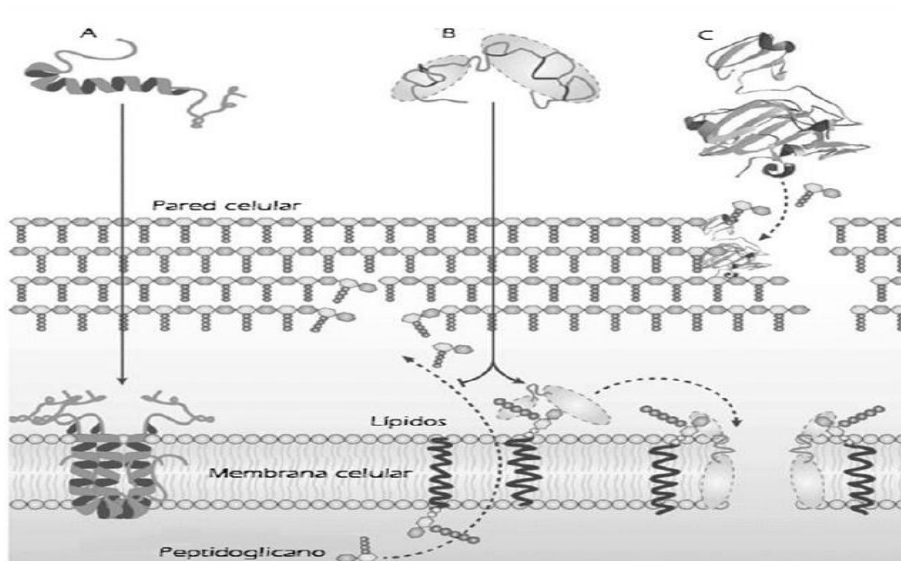
Las bacteriocinas son clasificadas de la siguiente forma:

- (i) Clase I. Lantibióticos: péptidos pequeños (uno o dos péptidos), estables al calor, contienen lantionina,  $\beta$ -metil-lantionina y dihidroalanina, que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de traducción.
- (ii) Clase II. No lantibióticos: de peso molecular variable, contienen aminoácidos regulares y son estables al calor. Se tienen tres subclases:
  - a. Clase IIa. Péptidos activos contra *Listeria*, tienen la secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC. Ejemplo: pediocina PA-1 y sakacina P.
  - b. Clase IIb. Son formadores de complejos de poración que consisten en dos péptidos diferentes. En este grupo se encuentran la lactococcina G y las plantaricinas EF y JK.
  - c. Clase IIc. Pequeños péptidos, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder. Solo se reportan la divergicina A y acidocina B.

- (iii) Clase III. Bacteriolisinas: termolábiles y son péptidos mayores a 30 kDa. Ejemplos: helveticinas J y V, acidofilicina A y lactacinas A y B (De Vuyst *et al.*, 2007; González-Martínez, 2003).

### 2.5.2. Modo de acción

El modo de acción de las bacteriocinas es complejo en cuanto a las más estudiadas como la nisina y la pediocina, en general actúan destruyendo la membrana citoplasmática a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños que altera la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía, la síntesis de proteínas o de ácidos nucleicos (ver figura 6).



**Fig. 6.** Modo de acción de las bacteriocinas. (A) Bacteriocinas clase I; (B) Bacteriocinas clase II y (C) Bacteriolisinas (Figuroa-González, 2010).

En el caso de las bacteriocinas clase IIa se ha sugerido que la región consenso amino terminal juega un papel importante en el reconocimiento de la membrana de la célula blanco. Las de clase IIb dependen de la acción de dos péptidos para la formación de poros y consecuente disipación del potencial de membrana (González-Martínez, 2003).

Algunos ejemplos de bacteriocinas y sus características se mencionan a continuación:

**Nisina:** aislada en 1928, fue la primera bacteriocina reportada y sintetizada por una BAL, *Lactococcus lactis* sp. *lactis* (Beshkova *et al.*, 2012). Es un péptido de 34 aminoácidos y menos de 5 kDa de peso molecular, es la única reconocida como GRAS (Generally Reconized As Safe) por la FDA. No requiere de un receptor unido a la membrana de la célula blanco ya que reconoce la composición fosfolípida de la célula. Es producida en forma natural en algunos productos lácteos donde se utiliza como aditivo para prevenir descomposición por gram positivas, por ejemplo *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria* (Dolz, 2008).

**Pediocina PA-1 y Sakacina P:** péptidos con secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC, importante en la capacidad de reconocimiento de la membrana de la célula blanco. La pediocina producida por *Pediococcus acidilactici* tiene elevada actividad contra especies de *Listeria* (Dolz, 2008).

**Lactococcina G y plantaricinas EF y JK:** Su síntesis está regulada por 5 operones con 21 genes diferentes, son promotores de la poración y tienen actividad antimicrobiana cuando actúan como un sistema de 2 péptidos diferentes necesarios para la formación de poros y con una consecuente disipación del potencial de membrana (Dolz, 2008).

**Divergicina A y acidocina B:** péptidos pequeños que se transportan mediante péptidos líder. Divergicina A con un peso molecular de 4.6 kDa es producida por *Carnobacterium divergens* LV13 que se caracteriza por poseer un sistema de secreción que involucra la presencia de un péptido señal. Esta bacteriocina es de naturaleza hidrofóbica y posee en su extremo N-terminal un sitio de rompimiento ASA lo que la hace diferir de la acidocina B que tiene un sitio de rompimiento GG, y actúa

como péptido señal para el uso del sistema de secreción de la célula (González-Martínez, 2003).

**Helveticinas J y V, acidofilicina A y lactacinas A y B:** peso molecular mayor a 30 kDa, son poco conocidas sus características bioquímicas y su modo de acción. Helveticina J producida por *Lactobacillus helveticus*, bacteriocina termolábil y el gen que la produce se localiza en el DNA cromosomal (Dolz, 2008).

**Lactococina A:** producida por ciertas cepas de *Lactococcus lactis*, su espectro antimicrobiano es reducido y se limita a ciertas cepas de *Lactococcus* (Dolz, 2008).

**Enterocina P:** producida por *Enterococcus faecium*, posee actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* (Dolz, 2008).

**Enterocina AS-48:** producida por *Enterococcus faecalis* S-48, posee estructura circular, es sensible a pH alcalino, estable a temperaturas por debajo de 70 °C y posee un amplio espectro de acción frente a numerosas bacterias, incluidas bacterias patógenas (Dolz, 2008; Gálvez, 1986).

## 2.6. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas contribuyen en la biopreservación de alimentos, mejoran las características sensoriales (sabor, olor y textura) y aumentan su calidad nutritiva. En general las BAL son cocos o bacilos gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y benzidina negativas, y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Ramírez *et al.*, 2011). Las más usadas en la industria de los alimentos son las que pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Muro *et al.*, 2011).

El sistema proteolítico de estas bacterias ha sido uno de los más estudiados dada su importancia tecnológica y puede ser dividido en tres etapas: proteinasas de la pared celular, que degradan las proteínas en péptidos; peptidasas intracelulares, que degradan los péptidos en aminoácidos libres; y un sistema de transporte que introduce a la célula los péptidos (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2012; Rojas-Ronquillo, 2009).

### **2.6.1. Género *Lactobacillus***

El género *Lactobacillus* pertenece al *filum Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, familia *Lactobacillaceae*, y sus parientes cercanos, que se agrupan en la misma familia, como el género *Paralactobacillus* y *Pediococcus*. La familia filogenéticamente más cercana es *Leuconostocaceae*, la cual incluye al género *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Weissella* (Felis *et al.*, 2007).

Los *Lactobacillus* son bacterias gram positivas, tienen formas variadas bacilos largos y delgados (diámetro de 0.5-1.1  $\mu\text{m}$ ), curvos o cortos, a menudo cocobacilos corineformes, no esporuladas; usualmente forman cadenas. La movilidad no es común; cuando la presentan es a través de flagelos peritricos. Metabolismo fermentativo; obligatoriamente sacarolítico. Anaerobios facultativos y microaerófilos, citocromo y catalasa negativos. No son patógenos (Madigan *et al.*, 2009) Tienen grandes exigencias nutritivas: vitaminas, derivados de ácidos nucleicos, péptidos, sales, aminoácidos, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables. Son negativos a gelatina, indol y ácido sulfhídrico. No suelen producir pigmentos, si los presentan son amarillo, naranja, rojo óxido o ladrillo. La relación Guanina-Citosina del ADN es 32-53%. La lactosa y galactosa son absorbidas por algunos lactobacilos por la ruta del fosfoenol-piruvato dependiente de la fosfotransferasa. La lactosa-fosfato que se forma es escindida en glucosa y D-galactosa-6-fosfato, esta última metabolizada por la vía D-tagatosa-6-fosfato (Bourgeois *et al.*, 1989; Sneath *et al.*, 1986).

El rango de temperatura de crecimiento es de 2-53 °C con su óptimo entre 30-40 °C. Su rango de pH esta entre 5.5-6.2 (Sneath *et al.*, 1986). Los lactobacilos son responsables de los últimos estadios de la mayoría de las fermentaciones lácticas (Madigan *et al.*, 2009). Se encuentran en ambientes donde hay disponibilidad de carbohidratos, tales como: productos lácteos, carne fermentada, masas agrías, vegetales, dulces y bebidas, sistema respiratorio, tracto gastrointestinal y genital de humanos y animales, y en aguas residuales y material vegetal (Felis *et al.*, 2007).

Este género se encuentra dividido en tres subgéneros: El grupo I, *Thermobacterium*, está formado por lactobacilos obligatoriamente homofermentativos. Las hexosas son fermentadas exclusivamente por vía Embdem-Meyerhof en ácido láctico. Las pentosas y los gluconatos no son asimilados.

El grupo II, *Streptobacterium*, incluye a los lactobacilos heterofermentativos facultativos. Fermentan las hexosas casi exclusivamente en ácido láctico siguiendo el ciclo Embdem-Meyerhof, y en condiciones de carencia de las mismas, se producen durante la fermentación productos como ácido acético y ácido fórmico. Las pentosas son fermentadas en ácido láctico y acético.

El grupo III, *Betabacterium*, corresponde a los heterofermentativos obligatorios. Las hexosas son fermentadas en ácido láctico y acético, etanol y CO<sub>2</sub>. Las pentosas son fermentadas a ácido láctico y acético (Bourgeois *et al.*, 1989; Salminen *et al.*, 2004).

Los lactobacilos son ampliamente utilizados en los productos derivados de la leche y algunas cepas se emplean para la preparación de leches fermentadas. Por ejemplo, *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*, son bacilos con extremos redondos, los podemos encontrar en cadenas sencillas y cortas, presentan buen crecimiento a 45 °C e incluso a 48-52 °C, fermentan carbohidratos como fructosa, glucosa, lactosa, manosa y sorbitol (Sneath *et al.*, 1986). Es capaz de producir grandes cantidades de



exopolisacárido a partir de sacarosa. Su crecimiento es bueno en un medio de pH 4.5-6.4, pero se detiene a pH 3.6-4.0 (Bourgeois *et al.*, 1989).

Dentro de este género también se encuentra el probiótico, *Lactobacillus rhamnosus* GG, bacteria homofermentativa, con una temperatura de crecimiento entre 15-45°C, no degrada carbohidratos como melobiosa, rafinosa y xilosa (Sneath *et al.*, 1986). Esta bacteria que se encuentra en el tracto digestivo humano y es considerada una bacteria benéfica que influye en la digestión de los alimentos. Existen estudios que relacionan al *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53013 con la producción de péptidos bioactivos con actividad antihipertensiva, y se ha reportado su efectividad en el tratamiento de diarrea por rotavirus y recaída de diarrea por *Clostridium difficile*, prevención de diarrea asociada al uso de antibióticos en niños, alivio de dermatitis atópica (eczema), reduce síntomas de fibrosis quística y la actividad de *Streptococcus mutans* relacionada con la reducción del riesgo de caries (Hernández-Ledesma, 2002; Salminen *et al.*, 2004). Así también, *Lactobacillus rhamnosus* GG está asociado a una baja producción de péptidos inhibidores de la ECA-I (Hamme *et al.*, 2009).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las BAL tienen un amplio historial de aplicación en productos fermentados por la influencia que ejercen sobre las características nutricionales, organolépticas y antimicrobianas asociadas a ácidos orgánicos, etanol, compuestos aromáticos, exopolisacáridos, bacteriocinas y péptidos bioactivos. Estos dos últimos grupos han atraído el interés de los investigadores por su potencial en la prevención de enfermedades y la conservación, calidad y seguridad de los alimentos (De Vuyst *et al.*, 2007; Dolz, 2008). En el caso de los péptidos bioactivos obtenidos de las proteínas de la leche presentan funciones antimicrobianas, inmunomoduladoras, antihipertensivas, antitrombóticas y de transporte de minerales (Torres-Llanez *et al.*, 2005). Los más estudiados son los implicados en el control de la presión arterial (FitzGerald *et al.*, 2006).

Con respecto a las bacteriocinas estas han jugado un papel importante en la industria de los alimentos, se han observado efectos inhibitorios de bacteriocinas producidas por el género *Lactobacillus* contra *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes* (Arokiyamara *et al.*, 2011).

En este marco, la investigación con *Lactobacillus rhamnosus* GG (*Lb. rhamnosus* GG), *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* (*Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus*) y su co-cultivo tiene como objetivo determinar y cuantificar la actividad de los péptidos antihipertensivos, antitrombóticos y bacteriocinas generados durante la fermentación de leche.

## 4. HIPÓTESIS

Durante la fermentación de la leche con *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 y su co-cultivo se presenta la liberación de péptidos con actividad biológica (antihipertensiva y antitrombótica) y bacteriocinas.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

- Determinar y cuantificar la actividad de los péptidos antihipertensivos, antitrombóticos y bacteriocinas generados durante la fermentación de leche con *Lb. rhamnosus* GG y *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772.

### 5.2. Objetivos particulares

- Determinar y cuantificar la actividad antihipertensiva y antitrombótica de los péptidos generados durante la fermentación de leche con *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 y su co-cultivo.
- Determinar y cuantificar la actividad de las bacteriocinas generadas durante la fermentación de leche con *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 y su co-cultivo, sobre *Listeria innocua* ATCC 33090, *Micrococcus luteus* CD-BBB1018 y *Escherichia coli* sp.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Fermentación

La propagación de *Lb. rhamnosus* GG (aislado de cápsulas Culturelle, ConAgra Functional Foods, EUA) y *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 (Rhodia-Textel Ltd., London UK) se hizo en caldo MRS (Man Rogosa Sharpe, Fluka analytical, Sigma-Aldrich, Suiza) durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente se inoculó leche entera y pasteurizada Santa Clara (Hidalgo, México). Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 1 L, con un volumen de trabajo de 500 mL. Los matraces de los cultivos individuales se inocularon con 5% v/v de cultivo ( $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>) y el de co-cultivo con 2.5% v/v de los cultivos individuales, y se incubaron 24 horas a 37 °C. Se tomaron muestras de 30 mL a las 0, 6, 12 y 24 horas con el fin de monitorear el pH, el crecimiento de microorganismos viables, grupos amino libres, producción de péptidos bioactivos y bacteriocinas.

### 6.2. Cuantificación de microorganismos viables

El crecimiento de las bacterias durante la fermentación se monitoreo mediante la cuenta en placa. Se realizaron diluciones de  $1 \times 10^{-5}$  en los tres primeros tiempos y  $1 \times 10^{-7}$  en el tiempo final. Las diluciones se realizaron en tubos eppendorff con 900 µL de agua peptonada al 0.5%.

De los tubos de dilución se tomaron 5 µL y se sembraron en placas de agar MRS divididas en cuatro (Miles *et al.*, 1938). Se dejaron secar por aproximadamente una hora antes de incubar a 37 °C. La cuenta se llevó a cabo para *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 y su co-cultivo.

### **6.3. Tratamiento de muestras**

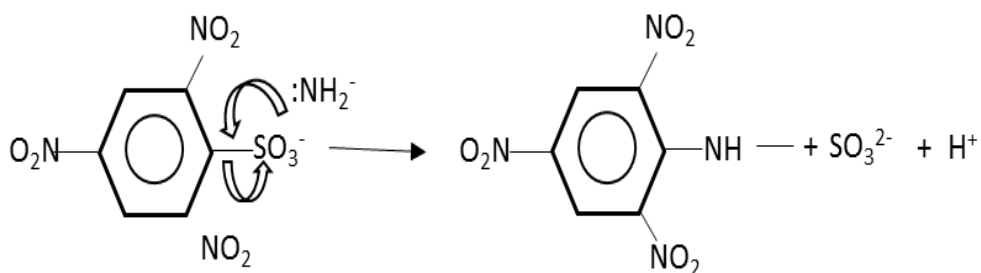
El control (leche sin fermentar) y las muestras tomadas durante la fermentación fueron utilizados en las pruebas posteriores tratándose en todos los casos de la misma forma. A cada muestra se le determinó el pH por medio de un potenciómetro (Conductonic pH 120, México) y posteriormente se ajustó a 4.5 con NaOH 1 M y/o HCl 1 M según fuera necesario, y fueron centrifugadas (centrifuga Beckman J2-MI, Rotor Beckman JA-20, EUA) a 10,000 rpm durante 30 minutos a 4 °C; enseguida se tomó el sobrenadante y se le ajustó el pH a 7, las muestras fueron centrifugadas nuevamente bajo las mismas condiciones.

Respecto a las muestras utilizadas para la determinación de péptidos con actividad antitrombótica solamente fue utilizado el sobrenadante de fermentación obtenido a las 24 horas y sólo se sometió a centrifugación (10000 rpm/30 min. a 4 °C) y el sobrenadante control (leche ajustada a un pH de 4.5) fue centrifugado bajo las mismas condiciones.

Todas las muestras ya acondicionadas fueron conservadas a -21 °C a excepción de las muestras para la prueba de bacteriocinas las cuales fueron almacenadas a 4 °C máximo 2 días, hasta el momento de efectuar las pruebas correspondientes.

### **6.4 Determinación de grupos amino libres (TNBS)**

El grado de proteólisis durante la fermentación se determinó por la técnica del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS); la cual se basa en la reacción de dicho ácido con grupos amino en un medio ligeramente alcalino y la reacción se interrumpe por una baja en el pH, como se muestra en la figura 7 (Alder-Nissen, 1979). El complejo resultante es un cromóforo de color naranja y percibe un máximo de absorbancia a los 340 nm (Goodwin *et al.*, 1970).



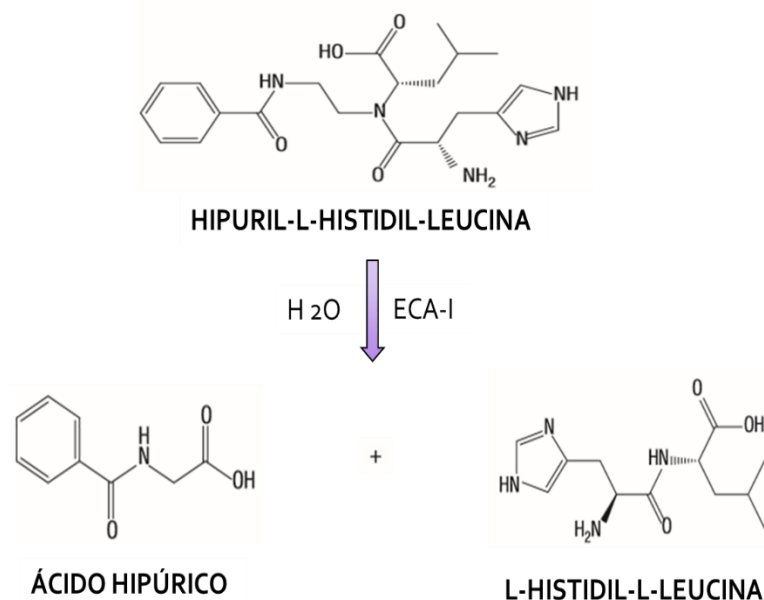
**Fig. 7** Reacción del ácido trinitrobencensulfónico con los grupos amino primarios (Alder-Nissen, 1979).

El procedimiento llevado a cabo fue el siguiente (Alder-Nissen, 1979):

- Se agregaron 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.2125 M, pH 8.2 en tubos de ensaye forrados con papel aluminio (la reacción es sensible a la luz).
- A cada tubo se le adicionaron 250  $\mu$ L de muestra (diluida 10 veces con el buffer de fosfatos pH 8.2). En el caso del tubo blanco en lugar de muestra se le agregó agua desionizada.
- Posteriormente fueron agregados 2 mL de ácido picrilsulfónico (Fluka. Sigam-Aldrich, Steinheim, Suiza) al 0.10% en amortiguador de fosfatos 0.2125 M, pH 8.2 (la preparación de esta solución se realizó justo antes de llevar a cabo la prueba, en la oscuridad) y cada tubo fue agitado.
- La mezcla fue incubada durante 1 hora a  $50 \pm 1$  °C en la oscuridad.
- La reacción se detuvo adicionando a cada tubo 4 mL de ácido clorhídrico 0.1 N y se agitó.
- Se leyó la absorbancia a 340 nm de longitud de onda contra el blanco; en celdas de cuarzo con un espectrofotómetro (Shimadzu, UV-1800, Japón).
- Se realizó una curva patrón usando glicina, y los resultados se reportaron como concentración de glicina ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).

## 6.5. Determinación de la inhibición de la ECA-I

La determinación de la actividad antihipertensiva de cada uno de los sobrenadantes de fermentación fue obtenida considerando la concentración de ácido hipúrico generada durante la reacción de la ECA-I con el sustrato HHL (Hipuril-L-Histidil-Leucina) (ver figura 8).



**Fig. 8** Hidrólisis del sustrato hipuril-L-histidil-L-leucina por la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I) a ácido hipúrico y L-histidil-L-leucina (Pegg *et al.*, 2007).

La reacción se llevó a cabo según Fuglsang *et al.* (2002) y Pegg *et al.* (2007) conforme los siguientes pasos:

- El pH de la muestra fue ajustado a 8.3 con NaOH 1 M y/o HCl 1 M.
- A 80  $\mu$ L de muestra se le adicionaron 200  $\mu$ L de amortiguador de sustrato (ácido bórico 0.1 M, NaCl 0.3 M, Hipuril-Histidil-Leucina (HHL) 5 mM, pH 8.3) y 20  $\mu$ L de enzima convertidora de angiotensina de riñón de cerdo (Sigma-Aldrich Co. LLC, EUA) 0.5 U mL<sup>-1</sup>.

- La mezcla de reacción fue incubada a 37 °C por 1 hora y detenida adicionando 250 µL de HCl 1 N.
- El sobrenadante fue filtrado (membrana de nylon 0.2 µm. Titan 2 HPLC filter purple, Rockwood, TN, EUA) e inyectado en un HPLC KNAUER Advance Scientific Instrument (Alemania) bajo las siguientes condiciones: una columna fase reversa (Jupiter 250x4.6 mm, 5 µm, Phenomex, Torrance, CA). Las corridas isocráticas fueron de 90 min con una fase móvil de acetonitrilo 12.5% (v/v), pH 3 y un flujo de 0.5 mL min<sup>-1</sup>. El detector utilizado fue UV (UV Detector 2500 KNAUER Advance Scientific Instrument, Alemania). La elución del ácido hipúrico fue monitoreada a una absorbancia de 228 nm.

El 0% de actividad fue medido sustituyendo los 20 µL de enzima por agua desionizada y el 100% de actividad sustituyendo la muestra (inhibidor) por 80 µL de amortiguador de borato 0.1 M, pH 8.3 libre de sustrato.

La inhibición de la ECA-I se obtuvo mediante la ecuación reportada por Wanasundara *et al.* (2002):

$$\text{Inhibición de la ECA-I (\%)} = \frac{[[\text{ácido hipúrico}]_{\text{control}} - [\text{ácido hipúrico}]_{\text{muestra}}]}{[\text{ácido hipúrico}]_{\text{control}}} \times 100$$

## 6.6. Determinación de la inhibición de formación del coágulo

La actividad antitrombótica se determinó por medio de la inhibición de la formación del coágulo a través del método reportado por Yang *et al.* (2007), en el que se mide la inhibición de la trombina, enzima encargada de convertir el fibrinógeno en fibrina, forma activa indispensable para la formación del coágulo.

- Se colocaron 140 µL de fibrinógeno (Sigma-Aldrich Co. LLC, EUA) al 0.1% en amortiguador Tris-HCL 0.05 M, pH 7.2 con NaCl 0.12 mM.



- Posteriormente fueron agregados 40  $\mu\text{L}$  de muestra (diluida 1:2 con amortiguador Tris-HCL 0.05 M, pH 7.2) o amortiguador (100% de actividad).
- La mezcla se incubó durante 10 minutos a 37 °C y la absorbancia se leyó a 405 nm.
- Se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de trombina 12 U  $\text{mL}^{-1}$  (Sigma-Aldrich Co., EUA) en amortiguador o solo el amortiguador (0% actividad).
- La mezcla se incubó durante 10 minutos a 37 °C y la absorbancia fue leída a 405 nm.

La prueba se llevó a cabo en un lector de microplacas BioTek ELx808 (EUA) y la inhibición de la formación del coágulo se calculó empleando la ecuación reportada por Zhang *et al.* (2008):

$$\text{Inhibición de la formación del coágulo (\%)} = \frac{(A-B) - (C-D)}{A-B} \times 100$$

donde:

A= absorbancia después de agregar la trombina e incubar (control)

B= absorbancia inicial del fibrinógeno (control).

C= absorbancia después de agregar la trombina e incubar (muestra).

D= absorbancia inicial de la muestra con fibrinógeno.

### **6.7. Determinación de la producción de bacteriocinas**

Para determinar la presencia de bacteriocinas en las distintas fermentaciones fue necesario realizar distintos tratamientos a los sobrenadantes con la finalidad de eliminar de manera secuencial los distintos compuestos inhibidores presentes. El primer tratamiento consistió en la neutralización de ácidos orgánicos mediante el ajuste del valor de pH de los sobrenadantes a 7.0 utilizando NaOH 1 M (Sezer *et al.*, 2009).

Posteriormente, se realizó una ultrafiltración (Ultracel-30, membrana de celulosa regenerada, corte 30000 Da, Millipore, EUA) mediante centrifugación a 3000 rpm durante 1 hora a 4 °C. A continuación se separó una parte del sobrenadante (20 mL) y al resto se le agregó catalasa (0.1 mg mL<sup>-1</sup>; Sigma-Aldrich Co., EUA) y se incubó (25 °C durante 90 min) para la eliminación de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), para inactivar la enzima se calentaron los sobrenadantes a 60 °C por 10 min (Sezer *et al.*, 2009). Parte de ese sobrenadante (10 mL) fue tratado con proteinasa K (0.1 mg mL<sup>-1</sup>, IBI Scientific, Peosta, IA), incubación a 37 °C durante 24 horas y a continuación se inactivó la enzima (60 °C durante 10 min). Este último tratamiento con el fin de eliminar las sustancias proteicas (bacteriocinas) presentes en las muestras (Mobarez *et al.*, 2008).

Los tres sobrenadantes obtenidos fueron evaluados después de cada tratamiento con la técnica reportada por Papagianni *et al* (2006).

Los microorganismos indicadores para determinar la presencia de bacteriocinas fueron *Escherichia coli* sp. (*E. coli* sp.), *Micrococcus luteus* CD-BBB1018 (*M. luteus* CD-BBB1018) y *Listeria innocua* ATCC 33090 (*L. innocua* ATCC 33090). Cada microorganismo se cultivó por separado: en caldo nutritivo *E. coli* sp., en caldo cerebro-corazón *M. luteus* CD-BBB1018 y en caldo nutritivo enriquecido con 2.5 g L<sup>-1</sup> de glucosa, 5 g L<sup>-1</sup> de NaCl y 15 g L<sup>-1</sup> de peptona de caseína *L. innocua* ATCC 33090 durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente, 12.5 mL de cada uno de los cultivos fue transferido a una botella serológica con 50 mL de medio fresco y se incubó durante 3 horas a 37 °C con una agitación de 150 rpm para obtener células en fase de crecimiento logarítmica.

Los tubos para realizar la prueba contenían 0.5 mL de los diferentes sobrenadantes a analizar y 2 mL de caldo de cultivo con el microorganismo indicador con una absorbancia inicial de 0.120 aproximadamente. Se midió la absorbancia a 650 nm de todos los tubos después de 3 horas de incubación a 37°C.

El porcentaje de inhibición del crecimiento fue determinado mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición de crecimiento (\%)} = 100 - \frac{A}{B} \times 100$$

donde:

A= absorbancia de prueba a las 3 horas.

B= absorbancia del control a las 3 horas.

### **6.8. Cromatografía de exclusión molecular**

Esta técnica se llevó a cabo con la finalidad de conocer la concentración y el peso de los péptidos encontrados en los sobrenadantes de las diferentes fermentaciones.

Las muestras se pasaron por filtros de 0.2  $\mu\text{m}$  de membrana de nylon (Titan 2 HPLC filter purple, Rockwood, TN, EUA) antes de ser inyectadas en un HPLC (KNAUER Advance Scientific Instrument, Alemania) con una columna de exclusión molecular (BioSep-Sec-S 2000, 300x7.8 mm, 5  $\mu$ , Phenomenex, EUA) para obtener fracciones de peso molecular conocido. Se realizaron corridas isocráticas de 30 minutos, con flujo de 0.9 mL  $\text{min}^{-1}$ ; la fase móvil fue amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 6.8 (procedimiento según el fabricante de la columna), se utilizó un detector UV (UV Detector 2500 KNAUER Advance Scientific Instrument, Alemania); la determinación se realizó a 280 nm (máxima longitud de onda del triptófano y donde los picos estaban mejor definidos). Bajo estas mismas condiciones fue inyectado un patrón de polipéptidos (Bio Rad, CA, EUA.) y corazonina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO., EUA) con un rango de 1.36-26.63 kDa con el fin de determinar los pesos moleculares de las fracciones obtenidas por medio de una curva patrón.

Para determinar la concentración de cada uno de los péptidos en las diferentes muestras se procedió a construir una curva patrón de  $\alpha$ -lactoalbúmina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), las concentraciones se calcularon a 280 nm.

## 7. DISEÑO EXPERIMENTAL

En el diseño experimental se consideraron dos factores: microorganismo (tres niveles) y tiempo (cuatro niveles). Las unidades experimentales constaron de matraces Erlenmeyer de 1 L, con un volumen de trabajo de 500 mL conformando un total de 12 matraces, dado que las fermentaciones fueron corridas por triplicado y considerando un control (sin someterlo a fermentación pero ajustando su pH a 4.5).

Las variables respuesta fueron: Log UFC mL<sup>-1</sup> (logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro), pH, grado de proteólisis (mg mL<sup>-1</sup> de glicina), generación de péptidos antihipertensivos (Inhibición de la ECA-I (%) y actividad específica), generación de péptidos antitrombóticos (Inhibición de la formación del coágulo (%) y actividad específica), producción de bacteriocina (Inhibición de crecimiento (%)), peso molecular (kDa) y concentración de péptidos ( $\mu$ g).

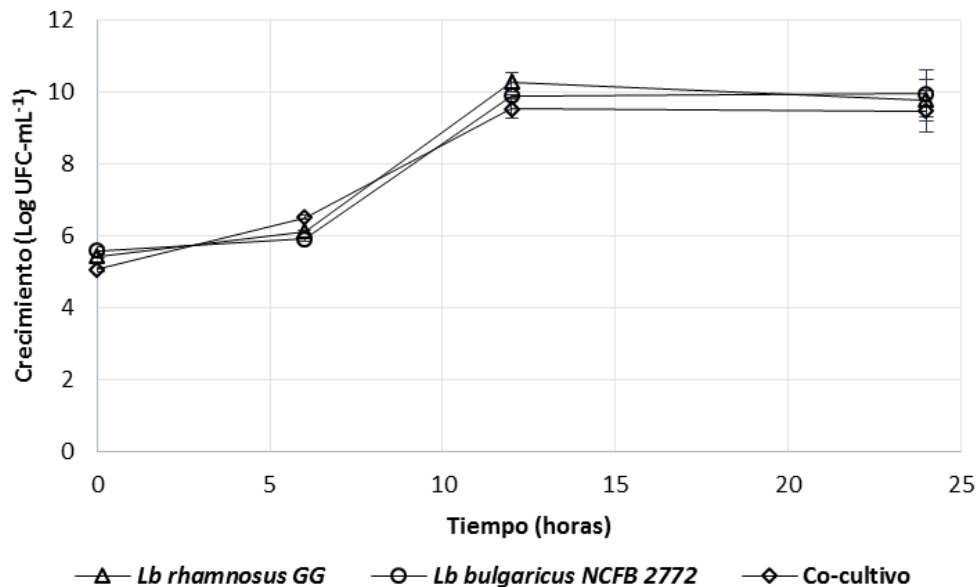
Para determinar si existían diferencias significativas dentro de cada una de las variables respuesta se realizaron pruebas de análisis de varianza (ANOVA), comparación de medias por el método Tuckey-Kramer con un nivel de significancia de 0.05 mediante el programa estadístico NCSS 2007 (Hintze, 2007).

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Crecimiento de BAL durante la fermentación en leche

El crecimiento de *Lb delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772, *Lb. rhamnosus* GG y su co-cultivo, fue determinado por el método de cuenta en placa.

En la figura 9 se observa que el crecimiento de cada uno de los microorganismos tuvo un comportamiento similar que se confirma al realizar el análisis estadístico, el cual indica que no hay diferencia significativa entre microorganismos pero si una diferencia significativa entre las 0 y 6 horas con respecto a las 12 y 24 horas de cada una de las fermentaciones. Entre estos dos últimos tiempos solo hay diferencia significativa entre el crecimiento de *Lb. rhamnosus* GG a las 12 horas con respecto al co-cultivo a las 24 horas de fermentación.



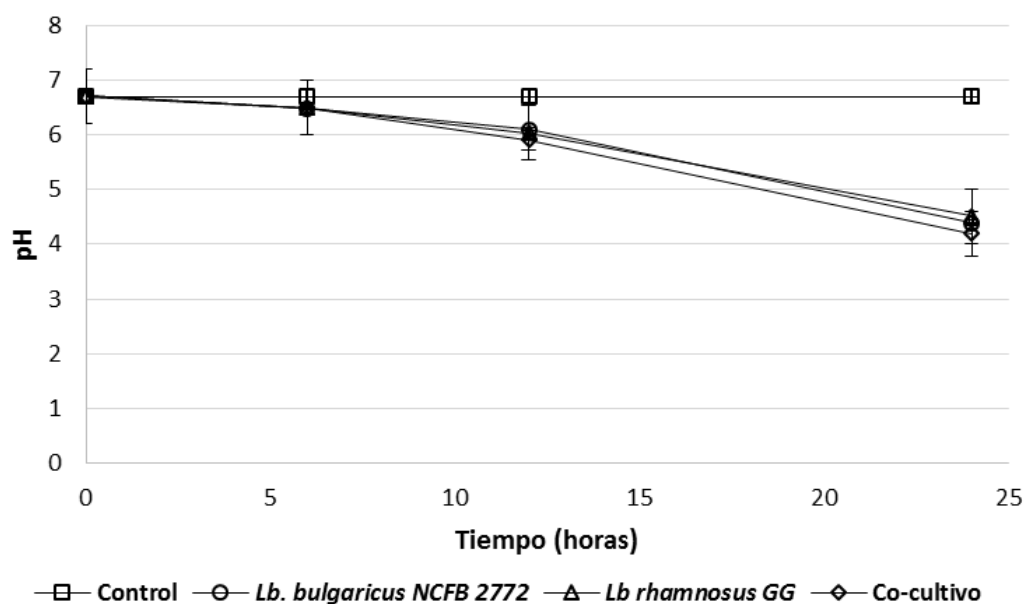
**Fig. 9** Crecimiento de BAL en las fermentaciones individuales y el co-cultivo.

El comportamiento del pH al igual que el crecimiento de los microorganismos presenta un comportamiento similar en cada una de las fermentaciones (ver figura 10).

El pH del control (6.69) y el inicial de cada una de las fermentaciones coincide con el reportado para leche de vaca (6.7-6.8), así como su descenso es propio del proceso de fermentación generado por BAL asociado a la producción de ácidos orgánicos como el láctico (Holzapfel *et al.* 1995; Villegas, 2004).

Al realizar el análisis estadístico no se observa una diferencia significativa entre el comportamiento de pH generado por cada uno de los microorganismos.

En el caso de los tiempos de fermentación no existe diferencia significativa entre el control y los primeros tiempos de fermentación (0 y 6 horas) para todas las muestras, pero éstos si difieren de las 12 y 24 horas de fermentación.



**Fig. 10** Evolución del pH durante la fermentación con BAL en cultivo individual y el co-cultivo.

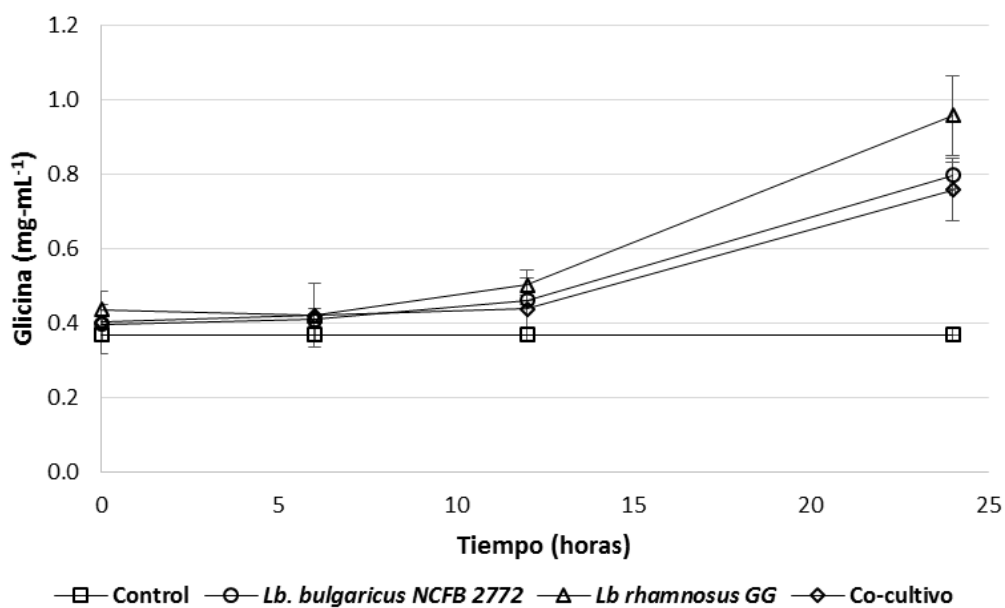
## 8.2. Determinación de grado de proteólisis por grupos amino libres

La determinación del grado de proteólisis durante la fermentación con las BAL se realizó por medio del método de TNBS, el cual nos ayuda a determinar los grupos amino libres.

La figura 11 muestra los resultados obtenidos respecto al grado de proteólisis durante las diferentes fermentaciones. Y como se puede observar en la fermentación con *Lb. rhamnosus* GG se obtuvo el mayor grado de proteólisis ( $0.9582 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Mientras que en las fermentaciones con *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 y el co-cultivo la proteólisis fue de  $0.7965$  y  $0.7580 \text{ mg mL}^{-1}$  de glicina, respectivamente. Respecto a las muestras de las 12 horas de fermentación no existe diferencia significativa entre ellas.

Este comportamiento implica que a medida que aumenta el tiempo de fermentación incrementa la concentración de grupos amino libres generados a través del sistema proteolítico de estas dos bacterias ácido lácticas dado que el degradar péptidos para obtener aminoácidos es un actividad metabólica central de las mismas (Christensen, *et al.*, 1999).

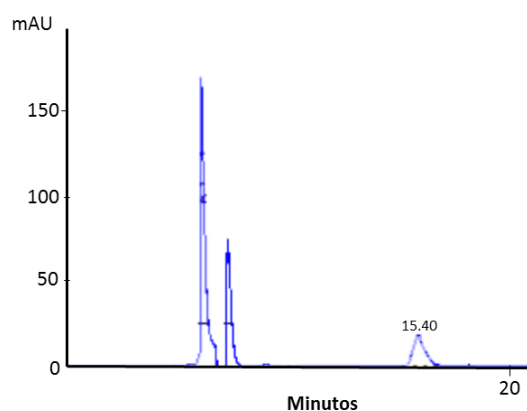
La presencia de proteólisis implica la generación de péptidos que en este caso podrían desempeñar alguna de las actividades biológicas (antihipertensiva y/o antitrombótica), objetivo de la presente investigación.



**Fig. 11** Determinación de grupos amino libres en las fermentaciones individuales y el co-cultivo.

### 8.3. Determinación de la inhibición de la ECA-I

La inhibición de la ECA-I (%) propiciada por cada una de las muestras de fermentación fue determinada considerando la generación de ácido hipúrico durante la reacción de la ECA-I con HHL y cada una de los sobrenadantes obtenidos. En el caso de una reacción donde hay un 0% de inhibición de la enzima se tiene una concentración de ácido hipúrico de 0.0285 mM (Área de 814.51, ver figura 12).

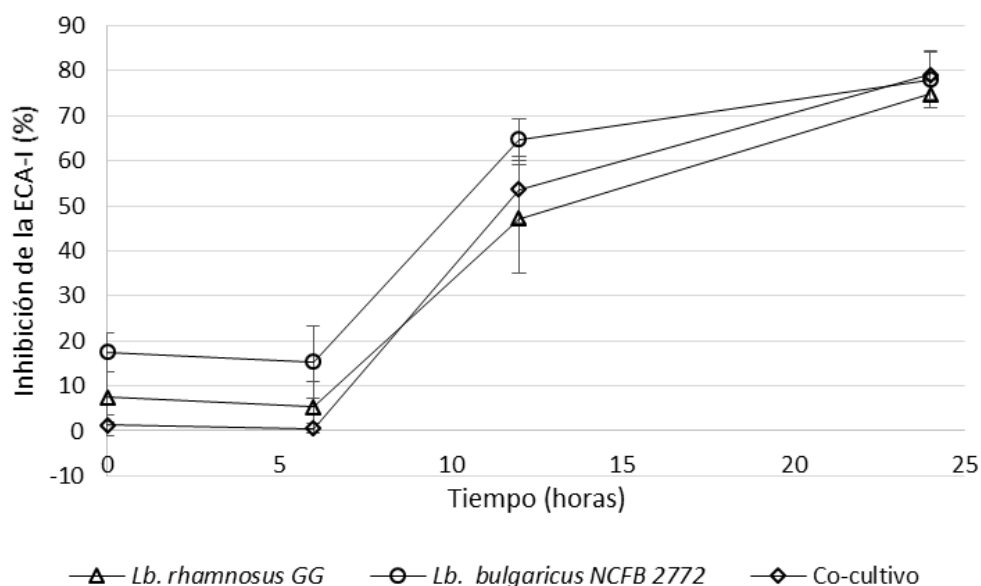


**Fig. 12** Cromatograma que representa el tiempo de elución de ácido hipúrico (15.40 min) y el área generada por una concentración de 0.0285 mM, cuando la ECA-I no es inhibida durante la reacción de ensayo.

La figura 13 muestra la inhibición de la ECA-I al adicionar los sobrenadantes provenientes de las diferentes fermentaciones pudiendo constatar un comportamiento similar al reportado por Rojas-Ronquillo *et al.* (2012) y Domínguez-González (2014) para *Lactobacillus casei* Shirota donde a medida que transcurre el tiempo de fermentación se incrementa la inhibición de la ECA-I (%).

Al realizar el análisis estadístico solo existe diferencia significativa entre las 0 y 6 horas respecto a las 12 y 24 horas de fermentación tanto con los microorganismos individuales y el co-cultivo, pero no existe una diferencia significativa entre microorganismos ya que tienen el mismo comportamiento. En el caso del sobrenadante de 12 horas de *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 la actividad inhibitoria no difiere de los sobrenadantes de 24 horas.





**Fig. 13** Inhibición de la ECA-I por los sobrenadantes de fermentación de *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 y su co-cultivo.

Los resultados obtenidos de los péptidos inhibidores de la ECA-I a partir de *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 a las 24 horas, se relacionan con los obtenidos por Gobbetti *et al.* (2000), quienes encontraron fracciones de péptidos con alta actividad inhibitoria de la ECA-I en leche fermentada con *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* SS1 y éstos provenían de la secuencia de  $\beta$ -caseína ( $\beta$ -CN) fragmento 6-14, f15 (6-14), f(7-14), f16(73-82), f(74-82) y f(75-82). Las fracciones obtenidas con mayor porcentaje de inhibición fueron la f15 y f16 con un 70%, y un  $IC_{50}$  de 0.0112 y 0.0103  $mg \cdot mL^{-1}$ . Mientras Qian *et al.* (2011) reportan para *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* LB340 una inhibición máxima de la ECA-I de  $66.42 \pm 1.82\%$  con un  $IC_{50}$  de  $67.71 \pm 7.2 mg \cdot mL^{-1}$ . Otros autores reportan para el extracto de leche fermentada con *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* 1466 un  $51.10 \pm 2.3\%$  de inhibición cuyo  $IC_{50}$  es de  $0.187 \pm 0.012 mg \cdot mL^{-1}$  (Donkor *et al.*, 2007).

Hernández-Ledesma (2002) obtuvo una actividad inhibidora de la ECA-I de 45.4% y 19.5% después de 72h de fermentar leche con *Lb. rhamnosus* CECT287 y *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* CECT4005, respectivamente. Mientras que en la

fermentación de un concentrado de proteínas del suero fue de 35% para *Lb. rhamnosus* y de 12% para *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus*. Hamme *et al.* (2009) obtuvieron a partir de 100 µg de proteína de suero fermentado por *Lb. rhamnosus* una actividad inhibidora de la ECA-I de 52±5%.

Otras investigaciones como la de Rokka *et al.* (1997) reportan la obtención de péptidos inhibidores de la ECA-I ( $\beta$ -caseína f(177-183) y f(193-202)) en leche UHT prefermentada con *Lb. casei* ssp. *rhamnosus* y subsecuentemente digerida como pepsina y tripsina. Y Moslehisad *et al.* (2013) señalaron que durante 21 días de almacenamiento *Lb. rhamnosus* PTCC 1637 fue capaz de producir péptidos a partir de proteínas de la leche con un IC<sub>50</sub> 2.483±0.148 a 3.947±0.029 mg·mL<sup>-1</sup>.

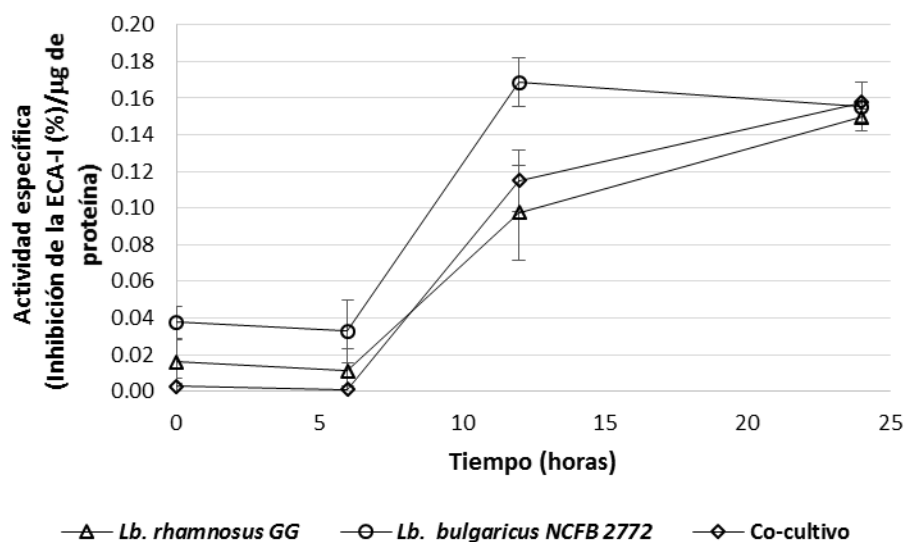
Pihlanto *et al.* (2010) señalaron que a partir de la fermentación de leche con *Lb. rhamnosus* ATCC7469 se obtuvieron péptidos que inhiben la actividad de la ECA-I en un 14%. Mientras González-González *et al.* (2011) en una fermentación de leche descremada reconstituida con *Lb. rhamnosus* reportaron un 62%. En tanto que durante la presente investigación y a las 24 horas de fermentación con *Lb. rhamnosus* GG se obtuvo un porcentaje de 74.86%, la diferencia con respecto a las demás investigaciones puede deberse a la técnica aplicada para determinar la concentración de ácido hipúrico.

Respecto al uso de co-cultivo para la generación de péptidos inhibidores de la ECA-I se esperaba un efecto mayor al de los cultivos individuales. Investigaciones como la de Pihlanto *et al.* (2010) reportaron que durante la fermentación de leche con *Lb. acidophilus* ATCC 4356 y *Leuconostoc mesenteroides* 358 el porcentaje de inhibición de la ECA-I a las 24 horas fue de 12%, mientras que para los cultivos individuales reportaron el 68% a las 24 y 44 horas de fermentación, respectivamente. Otras investigaciones señalan una inhibición de la ECA-I de 41.6% ± 2.4% para Sofúl® (tratado con acetronitrilo) al comparar ese porcentaje con el obtenido para los microorganismos individuales en una fermentación de un medio con caseínas este fue

de 20.2% para *Lb. casei* Shirota y de 10% para *Streptococcus thermophilus* (Domínguez-González, 2014; Rojas-Ronquillo, 2012).

En el caso del co-cultivo evaluado durante la presente investigación tenemos que a las 24 horas no hay diferencia significativa de la inhibición de la ECA-I con respecto a los cultivos individuales. Lo anterior podría estar asociado a las necesidades de cada uno de los microorganismos, o a que el perfil peptídico generado durante el proceso de proteólisis no es diferente al generado por las bacterias de manera individual, lo que se traduce en una similar actividad inhibidora de la ECA-I, para confirmar lo anterior sería recomendable purificar los péptidos encontrados de cada una de las fermentaciones (Domínguez-González, 2014).

Al relacionar la inhibición de la ECA-I con los microgramos de proteína obtenemos la actividad específica (ver figura 14). Al llevar a cabo el análisis estadístico tenemos una diferencia significativa solo entre las 0 y 6 horas respecto de las 12 y 24 horas. Cabe señalar que a las 12 horas la actividad específica del sobrenadante proveniente de *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 no difiere de los sobrenadantes de 24 horas.



**Fig. 14** Actividad específica de los sobrenadantes de fermentación de *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 y su co-cultivo.

Rojas-Ronquillo (2012) a partir de una fermentación de proteínas de suero con *Lb. casei* Shirota obtuvo fracciones con una actividad específica de  $0.52 \pm 0.05$  y  $1.47 \pm 0.05$  a las 15 horas de fermentación, en tanto que a las 21 horas la actividad se encontraba en un rango de 0.33-1.27. Al purificar algunas de esas fracciones la actividad específica alcanzó un máximo de  $3.85 \pm 0.26$ . En el presente experimento las actividades específicas obtenidas son menores, por lo que se consideraría importante el purificar los péptidos ya que con base a lo reportado por Rojas-Ronquillo (2012), la purificación aumentaría la actividad específica.

#### **8.4. Determinación de la inhibición de la formación del coágulo**

La actividad antitrombótica se determinó por la capacidad de los péptidos encontrados en los sobrenadantes de cada una de las fermentaciones (24 horas de incubación) para inhibir la coagulación del fibrinógeno por la trombina (Zhang *et al.*, 2008).

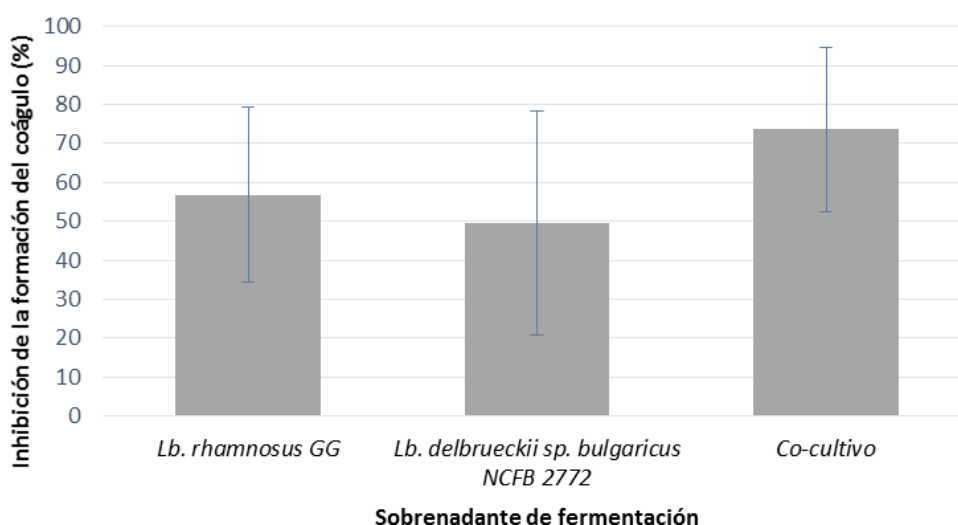
En la figura 15 se muestra la inhibición de la formación del coágulo (%) para cada una de las muestras. Al realizar el análisis de varianza no se observa una diferencia significativa de inhibición entre los diferentes sobrenadantes de fermentación.

Estos resultados se relacionan con los obtenidos por Rutherford *et al.* (2000) quienes señalaron la existencia de varios péptidos derivados de la  $\kappa$ -caseína y la lactoferrina, los cuales mostraron actividad antitrombótica al ser inhibidores de la agregación plaquetaria.

Fiat *et al.* (1993) encontraron que una concentración de  $750 \mu\text{M}$  del péptido KRDS inhibe la agregación plaquetaria inducida por adenosin difosfato (ADP) en un  $55 \pm 10\%$ . Autores como Guzmán-Rodríguez (2013) reportan un 58.2% y 53.5% de inhibición de formación del coágulo a partir de fermentaciones de leche con *Lb. casei* Shirota a las 20 horas de fermentación. Con este mismo microorganismo Rojas-Ronquillo *et al.*

(2012) encontraron una inhibición del 80.7% en una fermentación de caseína bovina a las 27 horas de fermentación.

En una leche comercial fermentada con *Lb. casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus* fueron generados seis péptidos cuyos valores de inhibición van de 33.8-83.1% (Domínguez-González, 2014). En yogur comercial, Dionysius *et al.* (2000) reportan un péptido proveniente del fragmento 113-116 de  $\kappa$ -caseína con actividad antitrombótica.

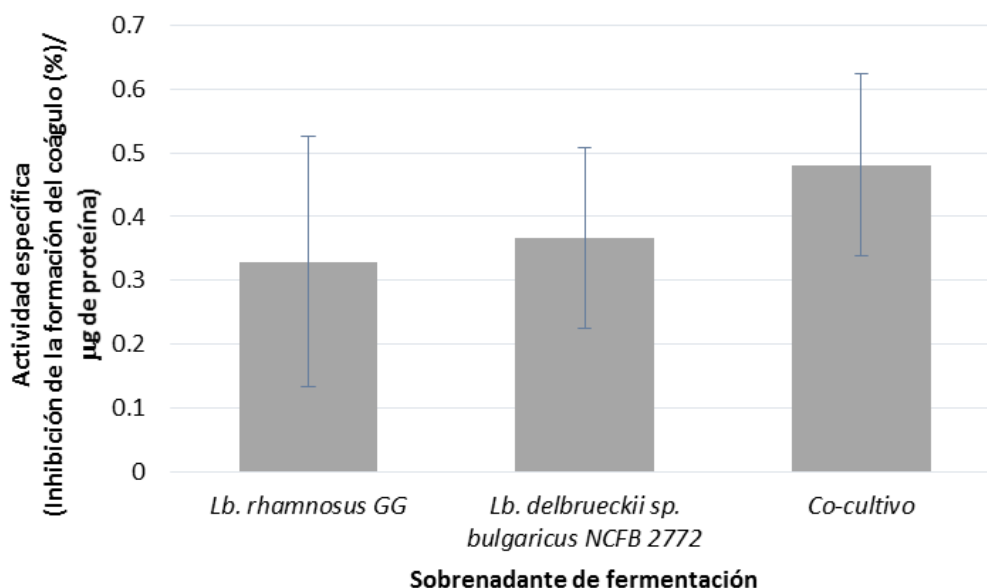


**Fig. 15** Inhibición de la formación de coágulo (%) por los diferentes sobrenadantes de la fermentación con *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 y su co-cultivo.

Por otra parte, al relacionar la inhibición de la formación del coágulo (%) con la concentración de péptidos ( $\mu\text{g}$ ) de las muestras se obtuvo la actividad específica (ver figura 16). Al realizar el análisis estadístico no se observa diferencia significativa entre los diferentes sobrenadantes de fermentación, por lo que se puede utilizar el sobrenadante de cualquiera de las tres fermentaciones realizadas.

Rojas-Ronquillo (2012) reporta que a partir de fermentaciones de caseínas con *Lb. casei* Shirota a las 27 y 36 horas se obtienen fracciones en un rango de actividad de

0.22-1.44 y 0.71-1.03, respectivamente. Al purificar algunas de esas fracciones los rangos de actividad son mayores 3.7-4.1 y 2.1-7.7, a las 27 y 36 horas respectivamente.



**Fig. 16** Actividad específica de los sobrenadantes de *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. delbrueckii* sp. bulgaricus NCFB 2772 y su co-cultivo.

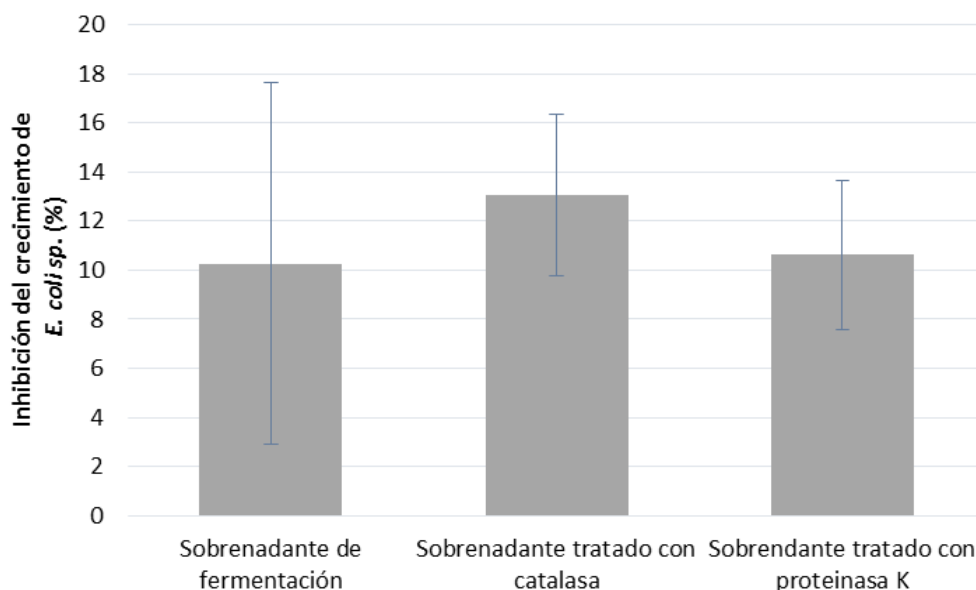
### 8.5. Determinación de la producción de bacteriocinas

La producción de bacteriocinas fue evaluada con las muestras obtenidas a las 24 horas de fermentación, las cuales fueron previamente tratadas para llevar a cabo la determinación de la inhibición del crecimiento de *E. coli* sp., *L. innocua* ATCC 33090 y *M. luteus* CD-BBB1018.

La figura 17 muestra la inhibición del crecimiento de *E. coli* sp. con el sobrenadante de la fermentación de leche con *Lb. rhamnosus* GG. Al realizar el análisis estadístico no se observa diferencia significativa de la inhibición del crecimiento de *E. coli* sp. con los sobrenadantes tratados con catalasa y proteinasa K. Respecto al sobrenadante tratado con catalasa se observa que la inhibición del crecimiento no disminuye, lo cual puede estar asociado a que *Lb. rhamnosus* GG genera una mínima cantidad de

peróxido de hidrógeno ( $2.4 \pm 0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) sobre el cual actúa la catalasa y por lo que el efecto obtenido no se observa (Cruz-Guerrero *et al.*, 2014).

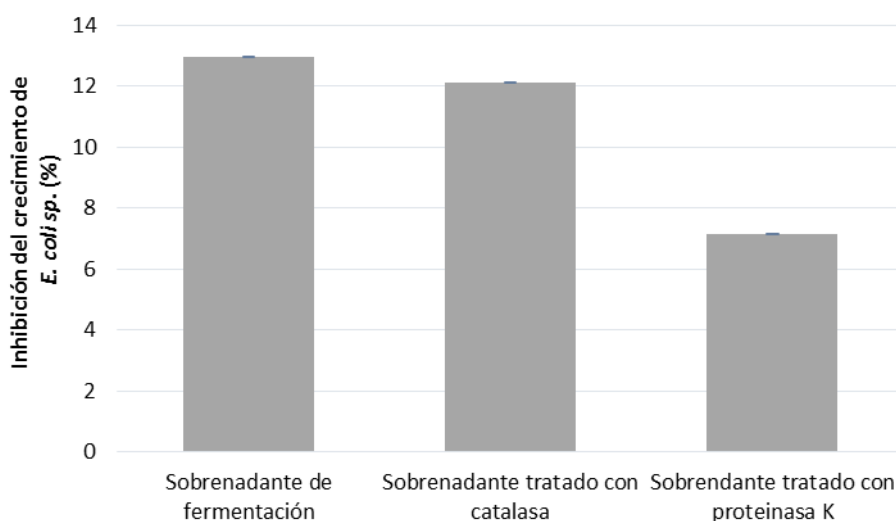
En cuanto al sobrenadante tratado con proteinasa K, se observa que la inhibición de *E. coli* sp. no es debida a sustancias proteicas, lo que concuerda con Fernández *et al.* (2003) quienes señalan que si al tratar el compuesto (sobrenadante) con proteinasa K se observa resistencia a la misma, se puede descartar la hipótesis de que sea una bacteriocina.



**Fig. 17** Inhibición del crecimiento *E. coli* sp. con el sobrenadante de la fermentación de leche con *Lb. rhamnosus* GG.

Este resultado de no inhibición por sustancias proteicas concuerda con el obtenido por Figueroa-González (2010) para *Lb. rhamnosus* GG considerando como fuente de carbono lactosa obtuvo 0 % de inhibición de crecimiento mientras que al utilizar como fuente de carbono glucosa reportó un 5.9% y usando Oligomate 55 un 3.7% de inhibición de crecimiento de *E. coli* K12. Simova *et al.* (2008) reportaron la inhibición de *E. coli* WF por una bacteriocina generada a partir de *Lb. rhamnosus* PC5 aislado de productos lácteos búlgaros.

En la figura 18 se observa que el sobrenadante proveniente de la fermentación de la leche con *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 inhibe el crecimiento de *E. coli* sp. en un 12.95%, pero al ser tratado para eliminar el peróxido de hidrógeno se tiene prácticamente la misma inhibición. Parte de esta inhibición se atribuye a la presencia de sustancias proteicas (bacteriocinas) dado que al tratar el sobrenadante con proteinasa K, la inhibición disminuye a 7.15%. Este resultado coincide con lo reportado con cepas de *Lb. delbrueckii* sp. aisladas de queso amarillo búlgaro que inhibieron a *E. coli* HB 101 (Miteva *et al.*, 1998). Otros autores como Simova *et al.* (2008) encontraron que *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* BB18 generó una bacteriocina que inhibió a *E. coli* WF.

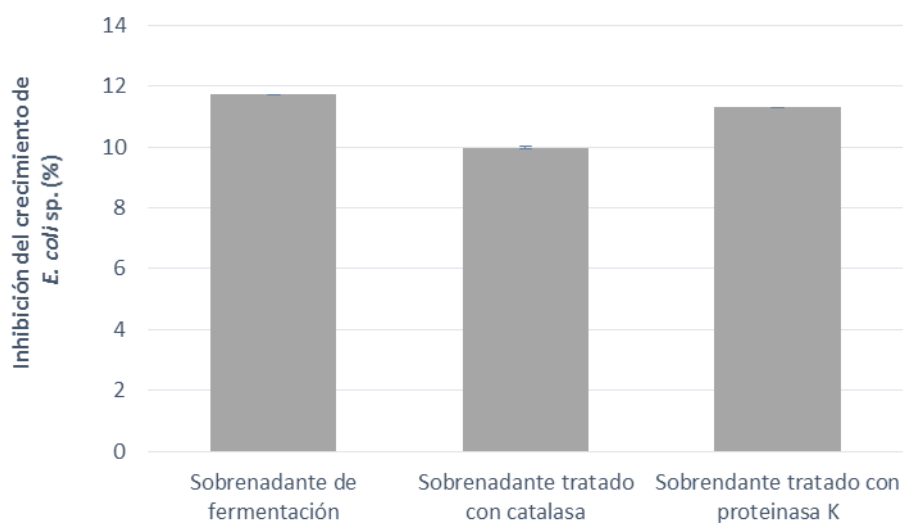


**Fig. 18** Inhibición de *E. coli* sp. con el sobrenadante de la fermentación de leche con *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772.

Respecto a la inhibición de crecimiento de *E. coli* sp. debida a las bacteriocinas generadas por el co-cultivo, el resultado fue negativo (ver figura 19), dado que al tratar el sobrenadante con catalasa y con proteinasa K se obtuvo la misma inhibición, y al realizar el análisis estadístico no hay diferencia significativa entre los tres sobrenadantes. Por lo tanto, el co-cultivo de los dos lactobacilos no favoreció la generación de bacteriocinas bajo estas condiciones de fermentación, pues incluso las



bacteriocinas detectadas en el cultivo individual de *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 no fueron detectadas.



**Fig. 19** Inhibición de *E. coli* sp. con el sobrenadante de la fermentación de leche con el co-cultivo.

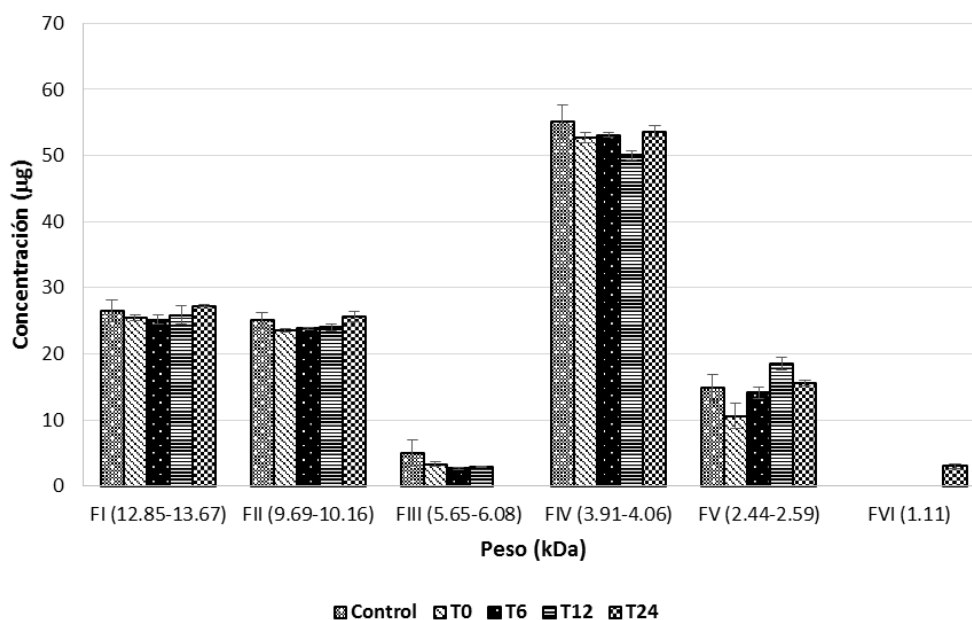
Cabe destacar que no se observó inhibición del crecimiento de *L. innocua* ATCC 33090 y *M. luteus* CD-BBB1018 con los diferentes sobrenadantes de la fermentación. En el caso de *Lb. rhamnosus* GG, los resultados concuerdan con lo obtenido por Figueroa-González (2010) donde reportan 0 % de inhibición del crecimiento de los mismos microorganismos indicadores a partir de probarlos con un sobrenadante obtenido de una fermentación utilizando como fuente de carbono lactosa.

## 8.6. Cromatografía de exclusión molecular

Con el fin de conocer la concentración y peso molecular de los péptidos encontrados en cada una de las fermentaciones las muestras fueron sometidas a una cromatografía de exclusión molecular.

La figura 20 muestra el rango de pesos moleculares y la concentración de las fracciones encontradas en el sobrenadante de fermentación de leche con *Lb.*

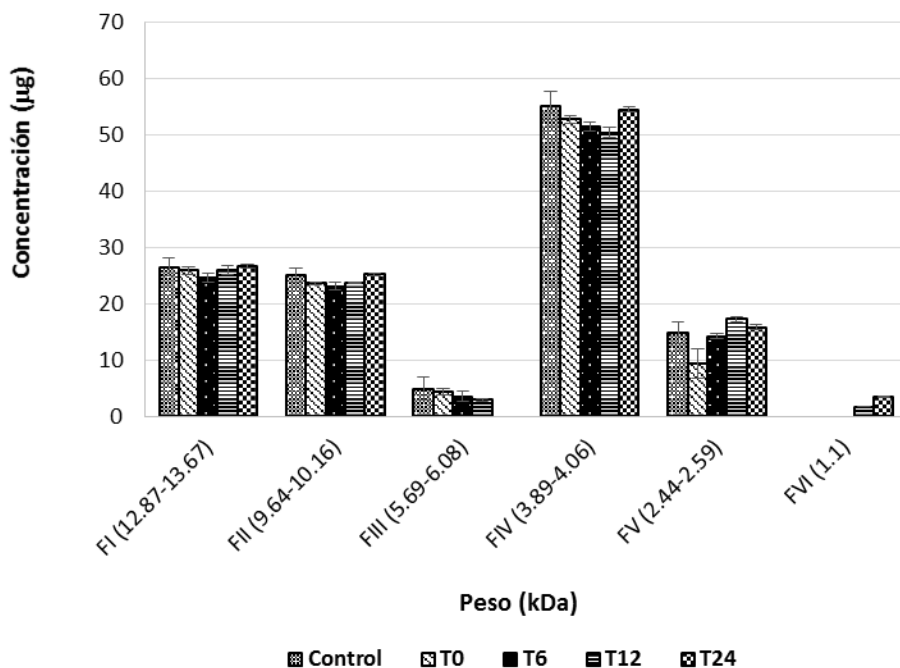
*rhamnosus* GG siendo la fracción IV la de mayor concentración en los diferentes tiempos. Cabe destacar que, durante las primeras 12 horas se detectaron solo cinco fracciones pero a las 24 horas de fermentación la fracción III no es detectada, aunque si la fracción VI. Esto indica que, durante el proceso de fermentación la hidrólisis de una proteína da lugar a un péptido de peso molecular intermedio y posteriormente finaliza con péptidos de bajo peso molecular (Gasson *et al.*, 1994; Figueroa-Hernández, 2007), por lo que se infiere que durante el proceso de fermentación la degradación de la fracción III pudo originar a la fracción VI, que corresponde a péptidos más pequeños cuyo peso molecular es de 1.11 kDa, esto también se relaciona con que a las 24 horas de fermentación se observó el mayor grado de proteólisis.



**Fig.20** Concentración y peso molecular (rango entre paréntesis) de las fracciones obtenidas en el sobrenadante de *Lb. rhamnosus* GG durante la fermentación.

El análisis estadístico indica que no hay una diferencia significativa de la concentración de las fracciones I y II en todos los tiempos, para la fracción III hay una diferencia significativa entre las 24 horas respecto al control y las 0 horas. La concentración de la fracción IV a las 12 horas difiere significativamente del control y las 24 horas. En el caso de la concentración de la fracción V a las 12 horas difiere de la obtenida en el control, las 0 y 6 horas.

El mismo comportamiento de las fracciones del sobrenadante de la fermentación con *Lb. rhamnosus* GG se observa en el sobrenadante de la fermentación de leche con *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772, a excepción de que a partir de las 12 horas es detectada tanto la fracción III y VI (ver figura 21).



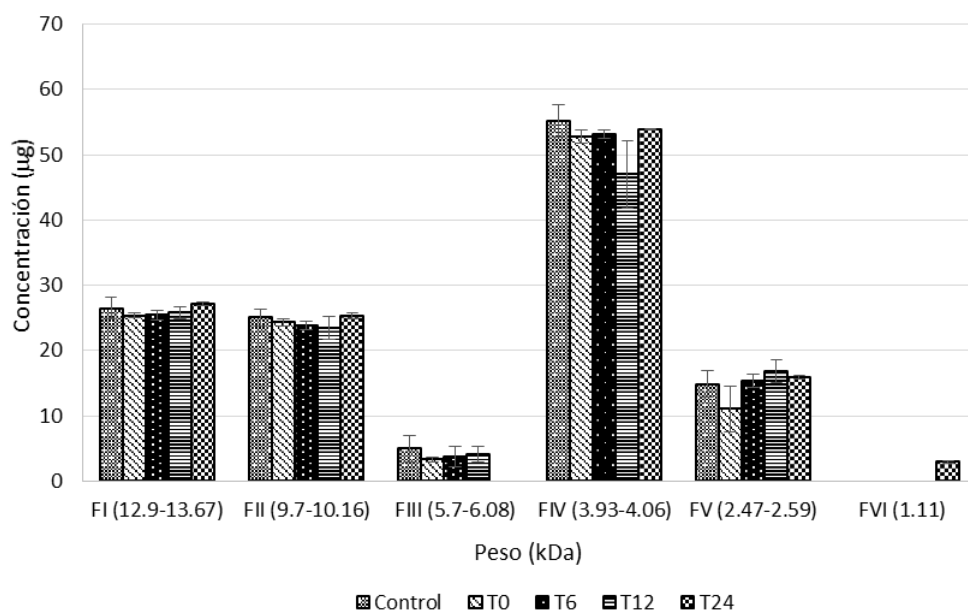
**Fig.21** Concentración y peso molecular (rango entre paréntesis) de las fracciones obtenidas en el sobrenadante de *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 durante la fermentación.

Al realizar el análisis estadístico no se encontró diferencia significativa de la concentración en la fracción I y II en los diferentes tiempos; en la fracción III el control, 0 y 6 horas difieren de las 24 horas. En el caso de la fracción IV hay diferencia significativa de las 12 horas con respecto al control y las 24 horas. En cuanto a la fracción V al tiempo 0 difiere de los demás tiempos. Respecto a la fracción VI la concentración de 12 y 24 horas no difieren entre sí.

En el caso del co-cultivo, se mantiene un comportamiento similar al de la fermentación de *Lb. rhamnosus* GG, dado que a las 24 horas no se detecta la fracción III pero si la fracción VI (ver figura 22). El comportamiento en la generación escalonada

de péptidos de menor peso molecular son reportados por Figueroa-Hernández (2007) en una fermentación de leche con *Lactococcus lactis*.

Al realizar el análisis estadístico no hay diferencia significativa de las fracciones I, II y III en todos los tiempos. En la fracción IV solo hay diferencia significativa de su concentración a las 12 horas respecto de los demás tiempos. La fracción V presenta diferencia significativa de su concentración a las 0 horas con respecto a las 12 horas.



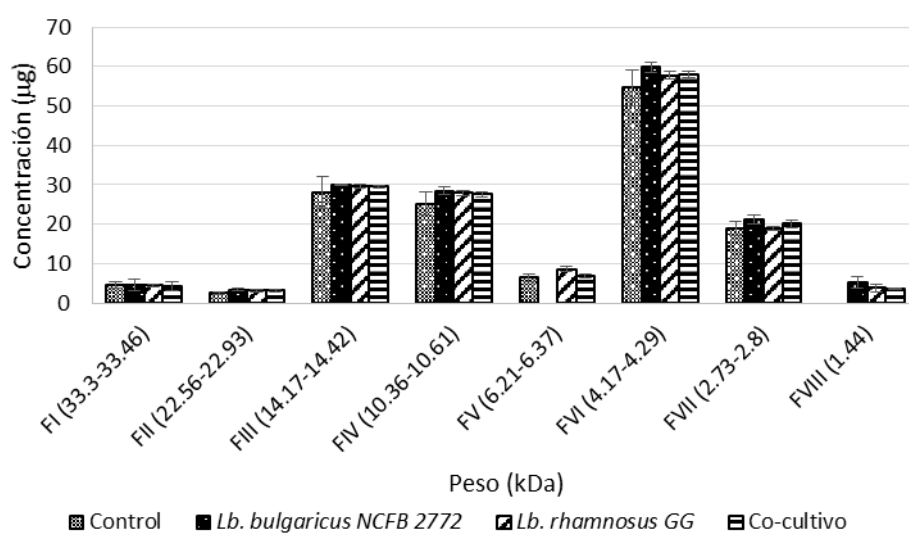
**Fig. 22** Concentración y peso molecular (rango entre paréntesis) de las fracciones obtenidas en el sobrenadante del co-cultivo durante la fermentación.

En el caso del sobrenadante de 24 horas utilizado para la determinación de péptidos con actividad antitrombótica tenemos que, las fracciones producidas fueron ocho, a diferencia de las seis fracciones obtenidas en los sobrenadantes utilizados en las determinaciones de actividad antihipertensiva y bacteriocinas, donde el pH juega un papel importante sobre el punto isoeléctrico de las proteínas.

En la figura 23, es posible observar que la fracción V del sobrenadante de *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 no es detectada. En tanto que para todas las

fermentaciones a excepción del control se obtiene la fracción VIII con un peso molecular de 1.44 kDa.

De acuerdo al análisis estadístico no existe diferencia significativa de la concentración en las fracciones I-IV y VII. En la fracción V no hay diferencia significativa del control con respecto a la fermentación de *Lb. rhamnosus* GG y el co-cultivo. En cuanto a la concentración de la fracción VI en la fermentación de *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772, está difiere del control.



**Fig. 23** Concentración y peso molecular (rango entre paréntesis) de las fracciones obtenidas en el sobrenadante con 24 horas de fermentación.

Dados los resultados obtenidos en la investigación podemos decir que existe la generación de secuencias peptídicas bioactivas. A partir de ello, es posible comparar el peso de las fracciones obtenidas en las diferentes fermentaciones con el de péptidos reportados como bioactivos. Para realizar la comparación se consideran como posibles equivalentes del péptido bioactivo en cuestión a péptidos que difieran del peso de éste en un rango de  $\pm 55$  Da para los péptidos mayores a 1 kDa (Figuroa-Hernández, 2007).

El rango de peso molecular de los péptidos generados en el sobrenadante utilizado para todas las determinaciones a excepción de la actividad antitrombótica se encuentra entre 1.10-13.67 kDa, en la tabla 5 se hace la comparación de estos péptidos con algunos reportados como bioactivos.

**Tabla 5.** Péptidos potencialmente bioactivos encontrados durante la fermentación de leche con *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 y su co-cultivo.

Fracción	Peso molecular	PM reportado	Posible origen	Posible bioactividad	Referencia
III	5.65-6.08	5.851	LF f(1-48)	Antimicrobiano	Dionysius <i>et al.</i> , 1997
IV	3.89-4.06	3.9948	$\beta$ -CN f(58-94)	Antihipertensivo	Yamamoto <i>et al.</i> , 1994
		3.8620	LF f(17-47)	Antimicrobiano	BIOPEP, 2014
		4.0348		Antihipertensivo	Yamamoto <i>et al.</i> , 1994
		4.0308	$\beta$ -CN f(58-94) $\alpha$ S <sub>2</sub> -CN f(180-207)	Antimicrobiano	BIOPEP, 2014
V	2.44-2.59	2.6620	$\beta$ -CN f(128-149)	Antihipertensivo	Robert <i>et al.</i> , 2004
		2.5389	$\alpha$ S <sub>2</sub> -CN f (39-61)	Antihipertensivo	Robert <i>et al.</i> , 2004
VI	1.10-1.11	1.1563	$\beta$ -CN f(193-202)	Antihipertensivo	BIOPEP, 2014

En la tabla 6 se hace una comparación del peso molecular de los péptidos potencialmente bioactivos obtenidos en los sobrenadantes de 24 horas de

fermentación utilizados en la determinación de actividad antitrombótica, respecto al peso molecular de péptidos reportados con actividad biológica y su posible origen.

**Tabla 6.** Péptidos potencialmente bioactivos encontrados en el sobrenadante con 24 horas de fermentación de leche con *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 y su co-cultivo.

Fracción	Peso molecular	PM reportado	Posible origen	Posible bioactividad	Referencia
V	6.21-6.37	7.150	ND	Antihipertensivo	Hong <i>et al.</i> , 2008
		6.089	ND	Antihipertensivo	Hong <i>et al.</i> , 2008
		5.970	ND	Antihipertensivo	Rojas-Ronquillo <i>et al.</i> , 2012
VI	4.17-4.29	4.100	CN	Antitrombótico	Rojas-Ronquillo <i>et al.</i> , 2012
VII	2.73-2.80	2.700	$\beta$ -CN, $\alpha$ S <sub>1</sub> -CN	Acarreador de minerales, antihipertensivo, antitrombótico e inmunomodulador	González-Olivares, 2011
		2.7108	$\alpha$ S <sub>1</sub> -CN f(59-79)	Acarreador de minerales	BIOPEP, 2014
		2.7642	$\alpha$ S <sub>1</sub> -CN f(1-23)	Inmunomodulador	BIOPEP, 2014
VIII	1.44	1.39	$\alpha$ S <sub>1</sub> -CN	Antihipertensivo Antitrombótico	González-González, 2011
		1.40	$\beta$ -CN f(94-106)	Antihipertensivo	Quirós <i>et al.</i> , 2005
		1.4639	$\beta$ -CN f(7-18)	Acarreador de minerales	BIOPEP, 2014

## 9. CONCLUSIONES

- Durante la fermentación de leche con *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 y su co-cultivo se generaron péptidos con actividad antihipertensiva y antitrombótica.
- La fermentación de leche con *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 generó bacteriocinas que inhiben el crecimiento de *E. coli* sp. pero no el de *L. innocua* ATCC 33090 y *M. luteus* CD-BBB1018.
- Las fermentaciones con *Lb. rhamnosus* GG y el co-cultivo no generaron bacteriocinas que inhibieran el crecimiento de los microorganismos indicadores.

## 10. PERSPECTIVAS

- Adicional a la fermentación llevar a cabo un proceso de digestión para verificar si se obtienen péptidos con mayor actividad u otras actividades biológicas (Hernández-Ledesma *et al.*, 2002; Rokka *et al.*, 1997).
- A partir de la actividad antihipertensiva y antitrombótica encontrada en los péptidos de las diferentes fermentaciones debe considerarse la purificación de los mismos. Con el fin de conocer si todas o solo algunas de las secuencias poseen esta actividad o si su actividad se incrementa.
- Al purificar los péptidos sería necesaria la evaluación *in vivo* de los mismos.
- Existen trabajos previos donde se elabora un queso con estos microorganismo se podría conocer cómo cambian los péptidos y la



bioactividad de los mismos, el comportamiento de las bacteriocinas durante la elaboración y almacenamiento del queso.

- La actividad antihipertensiva encontrada podría estar asociada a otras actividades biológicas, dado que investigadores reportan la relación de la actividad inhibidora de la ECA-I de los péptidos con una actividad antioxidante y opioide (Contreras *et al.*, 2009). Por lo que sería interesante determinar esas actividades en posteriores investigaciones de fermentaciones con *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772 y su co-cultivo.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Alder-Nissen, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzensulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* 27 (6): 1256-1262.
- Amiot, J. 1991. Ciencia y tecnología de la leche. Ed. Acribia. España.
- Arokiyamara, A., Sivakumar, P. K. 2011. Antibacterial activity of bacteriocin producing *Lactobacillus* sp. isolated from traditional milk products. *Curr. Botanic.* 2: 5-8.
- Beshkova, D., Frengova, G. 2012. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Eng. Life Sci.* 12 (4): 419-432.
- BIOPEP. 2014. Universidad de Warmia y Masuria. Polonia. Online: <http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>
- Bourgeois, C. M., Larpent, J. P. 1989. Microbiología alimentaria 2. Ed. Acribia, S. A. España.
- Chabance, B., Jollés, P., Izquierdo, C., Mazoyer, E., Francoual, C., Drouet, Fiat, A. M. 1995. Characterization of an antithrombotic peptide from  $\kappa$ -casein in newborn plasma after milk ingestion. *Brit. J. Nut.* 73: 583-590.
- Cheung, H. S., Feng, L. W., Ondetti, M. A., Sabo, E. F., Cushman, D. W. 1980. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting-enzyme. *J. Biol. Chem.* 255: 401-407.
- Christensen, J. E., Dudley, E. G., Pederson, J. A., Steele, J. L. 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 76: 217-246.
- Cleveland, J., Monteville, T. J., Nes, I. F., Chikindas, M. L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Inter. J. Food Microbiol.* 71: 1-20.
- Contreras, M. M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M., Recio, I. 2009. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *Int. Dairy J.* 19: 566-573.
- Cruz-Guerrero, A., Hernández-Sánchez, H., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M., Figueroa-González, I. 2014. Commercial probiotic bacteria and prebiotic carbohydrates: a fundamental study on prebiotics uptake, antimicrobials production and inhibition of pathogens. *J. Sci. Food Agric.* 94 (11): 2246-2252.
- De Vuyst, L., Leroy, F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Molec. Biotechnol.* 13: 194-199.
- Dionysius, D. A., Marschke, R. J., Wood, A. J., Milne, J., Beattie, T. R., Jiang, H., Treloar, T., Alewood, P. F., Grieve, P. A. 2000. Identification of physiologically functional peptides in dairy products. *Austr. J. Dairy Technol.* 55 (2): 103.
- Dionysius, D. A., Milne, J. M. 1997. Antibacterial peptides of bovine lactoferrina: purification and characterization. *J. Dairy Sci.* 80: 664-667.

- Dolz, M. C. 2008. Bacteriocinas de probióticos. Nuevos enfoques bioterapéuticos: PINHE. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*. 28(3): 20-37.
- Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., Shah, N. P. 2007. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Lait*. 86: 21-38.
- Domínguez-González, K. N. 2014. Purificación parcial de péptidos bioactivos con actividad antihipertensiva y antitrombótica de una leche comercial fermentada con *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Felis, G. E., Dellaglio, F. 2007. Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Curr. Issues Intestinal Microbiol*. 8: 44-61.
- Fernández, M. F., Boris, S., Barbés, C. 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol*. 94: 449-455.
- Fiat, A.M., Migliore-Samour, D., Jollès, P. 1993. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *J. Dairy Sci*. 76: 301-320.
- Figuroa-González, I. 2010. Estudio de prebióticos en el crecimiento de bacterias probióticas comerciales y en la síntesis de compuestos con actividad antimicrobiana. Tesis de doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Figuroa-Hernández, C. Y. 2007. Utilización del sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* para la generación de péptidos potencialmente bioactivos. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Figuroa-Hernández, C. Y., Cruz-Guerrero, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M., Jiménez-Guzmán, J. 2012. Producción de péptidos fijadores de calcio y hierro por *Lactococcus lactis* sp. *cremoris* NCFB 712. *Rev. Mex. Ing. Quím*. 11 (2): 1-9.
- FitzGerald, R. J., Meisel, H. 2000. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Brit. J. Nutr*. 84 ( Suppl. 1): S33-S37.
- FitzGerald, R. J., Murray, B. A. 2006. Bioactive peptides and lactic fermentations. *Int. J. Dairy Technol*. 59 (2): 118-125.
- FitzGerald, R. J., Murray, B. A., Walsh, D. J. 2004. Hypotensive peptides from milk proteins. *J. Nutr*. 134: 9805-9885.
- Fuglsang, A., Nilsson, D., Nyborg, N. C. B. 2002. Cardiovascular effects of fermented milk containing angiotensin-converting enzyme inhibitors evaluated in permanently catheterized, spontaneously hypertensive rats. *Appl. Environ. Microbiol*. 68: 3566-3569.
- Gálvez, A., Abriouel, H., Lucas, R. L., Omar, N. B. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol*. 120: 51-70.

- Gálvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E., Quesada, A., Montoya, E. 1986. Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Can. J. Microbiol.* 32(10): 765-771.
- Gasson, M. J., Vos, W. M. de. 1994, Cap. 4: The proteolytic system of lactic acid bacteria, genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. Editor Gasson, M. J.; de Vos, W. M., ed. Blackie Academic Professional and Chapman Hall. 196-210.
- Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F., Addeo, F. 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (9): 3898-3904.
- Gobbetti, M., Minervini, F., Rizzello, C. G. 2004. Angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactives peptides. *Int. J. Dairy Technol.* 57 (2/3): 173-188.
- Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A., Di, R. 2002. Latent bioactive peptides in milk proteins: Proteolytic activation and significance in dairy processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42 (3): 223-239.
- González-González, C. R., Tuohy, K. M., Jauregi, P. 2011. Production of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with probiotic strains: Effects of calcium, pH and peptides on the ACE-inhibitory activity. *Int. Dairy J.* 21: 615-622.
- González-Martínez, B. E., Gómez-Treviño, M., Jiménez-Salas, Z. 2003. Bacteriocinas de probióticos. *Rev. Salud Pública Nutr.* 4 (2).
- González-Olivares, L. G. 2011. Separación e identificación de péptidos bioactivos liberados por bacterias lácticas. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Goodwin, J. F., Choi, S. Y. 1970. Quantification of protein solutions with trinitrobenzensulfonic acid. *Clin. Chem.* 16: 24-31.
- Guzmán-Rodríguez, F. J. 2013. Estudio de péptidos acarreadores de minerales y antitrombóticos liberados durante la fermentación de leche con *Lactobacillus casei* Shirota. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Hamme, V., Sannier, F., Piot, M. J., Didelot, S. 2009. Crude goat whey fermentation by *Kluyveromyces marxianus* and *Lactobacillus rhamnosus*: contribution to proteolysis and ACE inhibitory activity. *J. Dairy Res.* 76: 152-157.
- Hartmann, R., Meisel, H. 2007. Food derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18: 163-169.
- Hayes, M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. 2007. Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: Bioactive peptide functions. *Biotech. J.* 2: 435-449.

- Hernández-Ledesma, B. 2002. Caracterización y bioactividad de péptidos obtenidos a partir de proteínas lácteas mediante hidrólisis enzimática y procesos fermentativos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Hernández-Ledesma, B., Contreras, M. M., Recio, I. 2011. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv. Colloid Interface Sci.* 165: 23-35.
- Hintze, J. 2007. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA. [www.ncss.com](http://www.ncss.com).
- Holzapfel, W. H., Geisen, R., Schillinger, U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 343-362.
- Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W., Chi, L. 2008. The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs?. *Peptides.* 29: 1062-1071.
- Jäkälä, P., Vapaatalo, H. 2010. Antihypertensive peptides from milk protein. *Pharmaceuticals.* 3: 251-272.
- Jollès, P., Caen, J. P. 1991. Parallels between milk clotting and blood clotting opportunities for milk-derived products. *Trends Food Sci. Technol.* 2: 42-43
- Jollès, P., Lévy-Toledano, S., Fiat, A. M., Soria, C., Gillessen, D., Thomaidis, A., Dunn, F. W., Caen, J. P. 1986. Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from  $\kappa$ -casein on platelet function. *Europ. J. Biochem.* 158: 379-382.
- Jollès, P., Loucheux-Lefebvre, M. H., Henschen, A. 1978. Structural relatedness of  $\kappa$ -casein and fibrinogen  $\gamma$ -chain. *J. Molec. Evol.* 11: 271-277.
- Korhonen, H. J. 2009<sup>a</sup>. Bioactive milk proteins and peptides: from science to functional applications. *Aust. J. Dairy Technol.* 64 (1): 16-25.
- Korhonen, H. 2009<sup>b</sup>. Milk derived bioactive peptides: From science to applications. *J. Funct. Foods.* 1(2): 177-187.
- Kudoh, Y., Matsuda, S., Igoshi, K., Old, T. 2001. Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* IFO13953. *J. Jap. Society Food Sci. Technol.* 48: 44-50.
- Li, G.-H., Le, G. W., Shi, Y. H., Shrestha, S. 2004. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutr. Res.* 24: 469-486.
- Madigan, T. M., Martinko, M. J., Dunlap, V. P., Clark, P. D. 2009. Biología de los microorganismos. 12 ed. Ed. Pearson Addison Wesley.
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., Malcata, F. X. 2007. Bovine whey proteins –Overview on their main biological properties. *Food Res. Int.* 40: 1197-1211.

- Maruyama, S., Suzuki, H. 1982. A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.* 46: 1393-1394.
- Meisel, H. 1997. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. *Livestock Prod Sci.* 50: 125-138.
- Meisel, H. 2004. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors.* 21: 55-61.
- Miles, A. A., Misra, S. S. 1938. The estimation of bactericidal power of the blood. *J. Hig.* 38: 732-749.
- Miteva, V., Ivanova, I., Budakov, I., Pantev, A., Stefanova, T., Danova, S., Moncheva, P., Mitev, V., Dousset, X., Boyaval, P. 1998. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by a *Lactobacillus delbrueckii* strain 1043. *J. Appl. Microbiol.* 85: 603-614.
- Mobarez, A. M., Doust, R. H., Sattari, M., Mantheghi, N. 2008. Antimicrobial effects of bacteriocin like substance produced by *L. acidophilus* from traditional yoghurt on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Sci.* 8 (1): 221-224.
- Montero, G. C., Monge, J. T. 2010. Patología de la trombosis. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica.* 591: 73-75.
- Moslehishad, M., Reza, E. M., Salami, M., Mirdamadi, S., Ezzatpanah, H., Niasari, N. A., Moosavi-Movahedi, A. A. 2013. The comparative assessment of ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions obtained from fermented camel and bovine milk by *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637. *Int. Dairy J.* 29: 82-87.
- Mulero, C. J., Zafrilla, R. P., Martínez-Cachá, M. A., Leal, H. M., Abellán, A. J. 2011. Péptidos bioactivos. *Clín. Invest. Arterioesclerosis.* 23 (5): 219-227.
- Muro, U. C., Álvarez, F. R. Riera, R. F., Arana, C. A., Téllez, J. A. 2011. Review: Production and functionality of active peptides from milk. *Food Sci. Technol. Internat.* 17 (4): 293.
- Ondetti, M. A., Cushman, D. W. 1982. Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annu. Rev. Biochem.* 51: 283-308.
- Papagianni, M., Avramidis, N., Filioussis, G., Dasiou, D., Ambrosiadis, I. 2006. Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates: assessing the factor "indicator microorganism". *Microb. Cell Fact.* 5 (30): 1-14.
- Pegg, R. B., Rybarczyk, A., Amarowicz, R. 2007. Determination of hippuric acid by RP-HPLC using two different analytical columns a short report. *Polish J. Food Nutr. Sci.* 57(4): 447-450.
- Pihlanto, A., Virtanen, T., Korhonen, H. 2010. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *Int. Dairy J.* 20: 3-10.

- Phelan, M., Kerins, D. 2011. The potential role of milk derived peptides in cardiovascular disease. *Food Funct.* 2: 153-167.
- Qian, B., Xing, M., Cui, L., Deng, Y., Xu, Y., Huang, M., Zhang, S. 2011. Antioxidant, antihypertensive, and immunomodulatory activities of peptide fractions from fermented skim milk with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB340. *J. Dairy Res.* 78: 72-79.
- Quirós, A. 2007. Leches fermentadas con actividad antihipertensiva: Identificación de péptidos y evaluación de su biodisponibilidad. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L., Recio, I.; 2005. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Peptides Derived from Caprine Kefir. *J. Dairy Sci.* 88: 3480-3487.
- Ramírez, R. J. C., Ulloa, R. P., Velázquez, G. Y. M, Ulloa, A. J., Romero, A. F. 2011. Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente.* 7: 1-16.
- Ricci, I., Artacho, R., Olalla, M. 2010. Milk protein peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory (ACE-I) activity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50: 390-402.
- Robert, M. C., Razaname, A., Mutter, M., Juillerat, M. A. 2004. Identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6923-6931.
- Rodríguez-Figueroa, J. C., González-Córdova, A. F., Torres-Llanez, M. J., García, H. S. 2012. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides produced in fermented milk by specific wild *Lactococcus lactis* strains. *J. Dairy Sci.* 95 (10): 5536-5543.
- Rodríguez-Franco, D. A., Vázquez-Moreno, L., Ramos-Clamont, M. G. 2005. Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: Mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 47 (3-4): 102-111.
- Rojas-Ronquillo. M. R. 2009. Perfil de péptidos bioactivos durante la fermentación de leche por *Lactobacillus casei* y *Streptococcus thermophilus*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Rojas-Ronquillo, M. R. 2012. Péptidos bioactivos de suero de leche y caseínas, liberados por la actividad proteolítica de *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Rojas-Ronquillo, R., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruíz, L., Reyes-Grajeda, J. P., Jiménez-Guzmán, J., García-Garibay, M. 2012. Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *Int. Dairy J.* 26: 147-154.

- Rokka, T., Syväoja, E. L., Tuominen, J., Korhonen, H. 1997. Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG fermented UHT-milk. *Milchwissenschaft*. 52: 675-678.
- Rutherford, K. J., Gill, H. S. 2000. Peptides affecting coagulation. *Bri. J. Nutr.* 84 (Suppl. 1): S99-S102.
- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh, T. 2000. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in gouda cheese. *J. Dairy Sci.* 83: 1434-1440.
- Saito, Y., Wanezaki, K., Kawato, A., Imayasu, S. 1994. Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58: 1767-1771.
- Santos M. A. 1995. Química y bioquímica de alimentos. Ed. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A. 2004. Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Marcel Dekker, Inc. 3<sup>rd</sup> ed. USA.
- Scheraga, H. A. 2004. The thrombin-fibrinogen interaction. *Biophys. Chem.* 112: 117-130.
- Sezer, C., Güven, A. 2009. Investigation of bacteriocin production capability of lactic acid bacteria isolated from food. *J. Faculty Vet. Med.* 15 (1): 45-50.
- Simova, E. D., Beshkova, D. M., Angelov, M. P., Dimitrov, Zh. P. 2008. Bacteriocin production by strain *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* BB18 during continuous prefermentation of yogurt starter culture and subsequent batch coagulation of milk. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35: 559-567.
- Sneath, A. H. P., Mair, S. N., Sharpe, E. M., Holt, G. J. 1986. Manual of Systemic Bacteriology Bergey's. Williams & Wilkins. Vol. 2. USA.
- Spadoti, L. M., Moreno, I. 2005. Peptídeos bioativos de produtos lácteos. *Funcionais & Nutracêuticos*. 26-38.
- Tambekar, D. H., Bhutada, S. A. 2010. Studies on Antimicrobial Activity and Characteristics of bacteriocins produced by *Lactobacillus* strains isolated from milk of domestic animals. *Internet J. Microbiol.* 8 (2).
- Torres-Llanez, M. J., Vallejo-Córdoba, B., González-Córdoba, A. F. 2005. Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche. *Arch. Latinoam. Nutr.* 5 (2).
- Venéreo, J. R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar.* 31:126-133.
- Vermeirssen, V., Van, C. J., Verstraete, V. 2004. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br. J. Nutr.* 92: 357-366.
- Villegas, G. A. 2004. Tecnología quesera. Edit. Trillas. 398 pp.
- Wanasundara, P. K. J. P D., Ross, A. R. S., Amarowicz, R., Ambrose, S. J., Pegg, R. B., Shand, P. J. 2002. Peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)



- inhibitory activity from defibrinated, hydrolyzed bovine plasma. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6981-6988.
- Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T. 1994. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* 77: 917-922.
- Yang, W.G., Wang, Z., Xu, S. Y. 2007. A new method for determination of antithrombotic activity of eggwhite protein hydrolysate by microplate reader. *Chinese Chem. Lett.* 18: 449-451.
- Zhang, S. B., Wang, Z., Xu, S. Y. 2008. Antioxidant and antithrombotic activities of rapeseed peptides. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85: 521-527.