



Unidad Iztapalapa

**Perfil de péptidos bioactivos durante la
fermentación de leche por *Lactobacillus
casei* y *Streptococcus thermophilus***

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestra en Biotecnología

PRESENTA

I. B. María Rebeca Rojas Ronquillo

DIRECTOR:

Dr. J. Mariano García Garibay

ASESORES:

M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz

Dra. Carmen Wachter Rodarte

Octubre de 2009

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT y además cuenta con el apoyo del mismo consejo, con el número de registro 471-O.

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

**Perfil de producción de péptidos bioactivos durante la fermentación de leche por
Lactobacillus casei y *Streptococcus thermophilus***

Que presentó

Ing. María Rebeca Rojas Ronquillo

Director:

Dr. J. Mariano García Garibay

Jurado:

Dr. Jorge Soriano Santos (Presidente)

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero (Secretario)

M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz

Dra. Carmen Wachter Rodarte

**Para mi pa y mi ma,
las hermanastras malditas,
la gela
y claro, para el corazón de pollo.**

Gracias...

A Dios, por ponernos en un mundo tan complejo y bello, para desenmarañarlo y admirarlo.

A mi Ma por las mañas y la confianza.

A mi Pa por el carácter y la libertad.

A Abby por las risas y locuras.

A Aimeé por el cariño y la fuerza.

A mis abues por sus oraciones, que funcionaron.

A mis tíos (Angel y Silvia, Thani y Alex) por la hospitalidad y los momentos.

A Gela por animarme, hacerme dudar, y hacerme decidir.

A Karina por las pláticas que impiden trabajar y el pan.

A los amigos y cuates por serlo.

Al doctor Mariano y la maestra Lore por su confianza y apoyo.

A todos en la PP2, por su ayuda en el trabajo, por las comidas, pláticas,...

A la doctora Alma, la maestra Lore, el doctor Jorge y la doctora Carmen por sus consejos y atención.

Y al último, especialmente a Cochis (Jar8, alias Jonathan Daniel), por todo, que es mucho; pero en especial, por mi media hora diaria, que me hizo olvidar la distancia por instantes y sobrevivir.

Índice

	Página
Resumen	1
1.Introducción	2
2.Antecedentes	4
2.1.Péptidos bioactivos	4
2.1.1.Péptidos antimicrobianos	5
2.1.2.Péptidos antihipertensivos	6
2.1.3.Péptidos antitrombóticos	7
2.1.4.Péptidos acarreadores de minerales	8
2.1.5.Péptidos inmunomoduladores	9
2.1.6.Péptidos opioides	10
2.1.7.Péptidos antioxidantes	11
2.2.Producción de péptidos bioactivos	12
2.2.1.Fermentación de leche	13
2.3.Proteínas de la leche	14
2.3.1.Caseínas	16
2.3.2.Proteínas del suero	18
2.4.Bacterias Ácido Lácticas	20
2.4.1.Sistema proteolítico	21
2.4.2. <i>Lactobacillus casei</i>	24
2.4.3. <i>Streptococcus thermophilus</i>	25
3.Justificación	27
4.Hipótesis	28
5.Objetivos	28
5.1.General	28
5.2.Particulares	28
6.Metodología	29
6.1.Plan de trabajo	29
6.2.Cepas utilizadas	30
6.3.Fermentación	30
6.4.Determinación de microorganismos viables	31
6.5.Toma de muestras	31
6.6.Determinación de grupos amino terminales por el método del Ácido Trinitrobenecensulfónico (TNBS)	32
6.7.Análisis de péptidos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE tricina	32
6.8.Determinación de Actividad Antihipertensiva por el método de Cushman y Cheung	36
6.9.Análisis estadístico	37
7.Resultados y discusión	38
7.1.Fermentaciones	38
7.1.1.Fermentaciones en leche	38
7.1.2.Fermentaciones en suero de leche y caseínas	40
7.2.Determinación del grado de proteólisis mediante los grupos amino terminales	42
7.3.Determinación de pesos moleculares por SDS-PAGE	44
7.4.Determinación de la actividad antihipertensiva	50

8. Conclusiones	53
9. Bibliografía	54
10. Apéndices	59
10.1. Preparación de reactivos	59
10.1.1. Medios de cultivo	59
10.1.2. Soluciones del método de TNBS	59
10.1.3. Soluciones de electroforesis (SDS-PAGE)	60
10.1.4. Soluciones para la determinación de antihipertensivos	62
10.2. Curvas patrón	63
10.2.1. Curva patrón del método de TNBS	63
10.2.2. Curvas patrón de electroforesis	63

Índice de tablas

	Página
Tabla 2.1 Péptidos (de leche) con actividad antimicrobiana	5
Tabla 2.2 Secuencias fosforiladas en caseínas bovinas	8
Tabla 2.3 Ejemplos de péptidos derivados de proteínas de leche con actividad opioide	11
Tabla 2.4 Ejemplos de péptidos bioactivos liberados de proteínas de la leche por varios microorganismos	14
Tabla 2.5 Concentración y funciones biológicas de las principales proteínas de la leche de vaca	15
Tabla 2.6 Producción de ácido láctico, acético y etanol por <i>Lactobacillus casei</i>	24
Tabla 6.1 Reactivos para la preparación del gel separador	34
Tabla 6.2 Reactivos para la preparación del gel espaciador	34
Tabla 6.3 Reactivos para la preparación del gel concentrador	34
Tabla 7.1 Pesos moleculares (kDa) de los péptidos encontrados en la fermentación en leche con <i>Lactobacillus casei</i>	45
Tabla 7.2 Pesos moleculares (kDa) de los péptidos encontrados en la fermentación en leche con <i>Streptococcus thermophilus</i>	46
Tabla 7.3 Pesos moleculares (kDa) de los péptidos encontrados en la fermentación en leche con cultivo mixto	47
Tabla 7.4 Pesos moleculares (kDa) de los péptidos encontrados en la fermentación en caseínas con <i>Lactobacillus casei</i>	47
Tabla 7.5 Pesos moleculares (kDa) de los péptidos encontrados en la fermentación en caseína con <i>Streptococcus thermophilus</i>	49
Tabla 7.6 Comparación por pesos moleculares de los péptidos encontrados durante las fermentaciones en leche, suero de leche y caseínas, con péptidos con actividad antihipertensiva reportados	50
Tabla 10.1 Amortiguador de la muestra	61
Tabla 10.2 Estándar de polipéptidos (pesos moleculares, kDa)	63

Índice de figuras

	Página
Figura 2.1 Modelo de la vía proteolítica, incluye transporte de dipéptidos y tripéptidos y el sistema de transporte de aminoácidos	22
Figura 6.1 Diagrama de la metodología	29
Figura 6.2 Reacciones catalizadas por la enzima convertidora de angiotensina	36
Figura 7.1 Electroforesis en gel de poli(acrilamida) de la fermentación en	45

leche con <i>Lactobacillus casei</i>	
Figura 7.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida de la fermentación en leche con <i>Streptococcus thermophilus</i>	46
Figura 7.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida de la fermentación en leche con cultivo mixto	46
Figura 7.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida de la fermentación en caseínas con <i>Lactobacillus casei</i>	47
Figura 7.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida de la fermentación en suero de leche con <i>Lactobacillus casei</i>	48
Figura 7.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida de la fermentación en caseínas con <i>Streptococcus thermophilus</i>	48
Figura 7.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida de la fermentación en suero de leche con <i>Streptococcus thermophilus</i>	49

Índice de gráficas

	Página
Gráfica 7.1 Crecimiento de los tres cultivos durante la fermentación en leche, <i>Lactobacillus casei</i> (Lb), <i>Streptococcus thermophilus</i> (St) y cultivo mixto (CM)	39
Gráfica 7.2 Perfil de pH de los tres cultivos durante la fermentación en leche, <i>Lactobacillus casei</i> (Lb), <i>Streptococcus thermophilus</i> (St) y cultivo mixto (CM)	39
Gráfica 7.3 Crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> (Lb) y <i>Streptococcus thermophilus</i> (St) en suero de leche (S) y caseínas (C)	41
Gráfica 7.4 Perfil de pH de <i>Lactobacillus casei</i> (Lb) y <i>Streptococcus thermophilus</i> (St) en suero de leche (S) y caseínas (C)	41
Gráfica 7.5 Grupos aminos terminales de los tres cultivos durante la fermentación en leche	43
Gráfica 7.6 Grupos aminos terminales de <i>Lactobacillus casei</i> (Lb) y <i>Streptococcus thermophilus</i> (St) en suero de leche (S) y caseínas (C)	43
Gráfica 7.7 Actividad antihipertensiva por inhibición de ACE de las muestras de las fermentaciones en leche con (Lb) <i>Lactobacillus casei</i> , (St) <i>Streptococcus thermophilus</i> , (CM) Cultivo mixto	51
Gráfica 7.8 Actividad antihipertensiva por inhibición de ACE de las muestras de las fermentaciones en suero de leche con <i>Lactobacillus casei</i>	51
Gráfica 10.1 Curva patrón para TNBS de glicina	63
Gráfica 10.2 Curva patrón de electroforesis para las muestras de la fermentación en leche con <i>Lactobacillus casei</i>	64
Gráfica 10.3 Curva patrón de electroforesis para las muestras de la fermentación en leche con <i>Streptococcus thermophilus</i>	64
Gráfica 10.4 Curva patrón de electroforesis para las muestras de la fermentación en leche con el cultivo mixto	64
Gráfica 10.5 Curva patrón de electroforesis para las muestras de la fermentación en caseínas con <i>Lactobacillus casei</i>	65
Gráfica 10.6 Curva patrón de electroforesis para las muestras de la fermentación en caseínas con <i>Streptococcus thermophilus</i>	65

Resumen

Con el fin de profundizar en el estudio de la producción de péptidos antihipertensivos a partir de leche se llevaron a cabo fermentaciones de leche, suero de leche y caseínas con *Lactobacillus casei* y *Streptococcus thermophilus* aislados de la leche comercial Sofúl, tanto de cada especie por separado como en cultivo mixto. A lo largo de la fermentación se determinaron las unidades formadoras de colonia, se registró el pH del medio y se analizó la proteólisis generada por estos cultivos mediante la determinación de grupos amino terminales liberados y por electroforesis de péptidos producidos por la hidrólisis de las proteínas. Se midió la actividad antihipertensiva de la leche fermentada por los tres cultivos ya mencionados a diferentes tiempos de la fermentación, por medio de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina.

Se observó que el inicio y la estabilización del crecimiento coinciden con la disminución y estabilización del pH y los grupos amino terminales, en las fermentaciones de los tres medios y con los tres diferentes cultivos. *Streptococcus thermophilus* tuvo una actividad fermentativa mayor, acidificando el medio más rápido que *Lactobacillus casei*, en el cultivo mixto se observó un comportamiento similar al de las fermentaciones con *Streptococcus thermophilus*, sin embargo, en todos los casos al final de la fermentación ambas bacterias alcanzan valores similares de pH.

El perfil de péptidos producido por cada microorganismo y el cultivo mixto durante la fermentación de leche, muestra diferencias en términos de su peso molecular, lo cual sugiere que la producción de péptidos bioactivos es dependiente de la actividad proteolítica específica de cada cultivo. Se encontraron péptidos por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida con pesos moleculares similares a péptidos reportados como antihipertensivos.

Se encontró actividad antihipertensiva en las leches fermentadas con *Lactobacillus casei*, *Streptococcus thermophilus* y cultivo mixto en diferentes tiempos de la fermentación. Esto corrobora que existen péptidos con actividad antihipertensiva, producidos por medio del sistema proteolítico de ambas bacterias. La actividad antihipertensiva varió en cada cultivo; las actividades máximas en cada caso fueron: *Lactobacillus casei*, 47%, a las 27h; *Streptococcus thermophilus*, 24%, a las 6 h; y el cultivo mixto, 37% a las 15 h. Esto indica que los péptidos bioactivos liberados presentan un perfil de producción específico para cada microorganismo y para el cultivo mixto.

1. Introducción

Los productos lácteos fermentados no solo son una fuente rica en nutrientes, son también fuente de péptidos bioactivos que pueden mejorar la salud cuando son ingeridos. Esta es la principal premisa sobre la que se basa la investigación de los péptidos con actividad biológica; éstos pueden afectar positivamente diferentes sistemas: cardiovascular, digestivo, inmune y nervioso; dependiendo de la secuencia de residuos de aminoácidos. Los beneficios que éstos pueden brindar al consumirlos son muchos, es por esto que su estudio es de gran interés. Hoy en día las proteínas de la leche son consideradas la fuente más importante de péptidos bioactivos (Korhonen y Pihlanto, 2006).

Es evidente que los péptidos bioactivos originados en las proteínas de la leche, deben tomarse en consideración como potenciales componentes funcionales de alimentos, más específicamente en los productos lácteos fermentados. En el mercado actual los alimentos no son recomendados o publicitados solo por sus características organolépticas (sabor, color, aroma), también es de importancia para el consumidor su contenido nutricional, y más aun su funcionalidad; hay una gama de productos alimenticios que apuntan más a la prevención y/o tratamiento de ciertos padecimientos: diabetes, hipertensión, enfermedades cardiacas, etc. Péptidos derivados de la caseína ya han sido considerados como suplementos alimenticios, éstos pueden ser manufacturados a escala industrial (Meisel, 1997); por ejemplo, los fosfopéptidos de las caseínas, que son acarreadores de metales, se han sugerido para suplementar productos como el pan, harina, bebidas, goma de mascar, y para algunas preparaciones farmacéuticas como tabletas, pasta de dientes y material para relleno dental.

Es por esto que el estudio de los péptidos bioactivos es materia del presente trabajo, poniendo especial atención en la actividad antihipertensiva, la cual puede ser evaluada *in vitro*. Estudios y pruebas sobre estas propiedades han sido ampliamente reportadas en varios trabajos. Se detallan algunas otras actividades de los péptidos bioactivos y ejemplos de éstos, como parte del marco teórico. También se revisa brevemente las características de las proteínas de la leche, así como las bacterias ácido lácticas y su sistema proteolítico. Se comenta más ampliamente sobre *Lactobacillus casei* y *Streptococcus thermophilus*. Se describen las técnicas utilizadas en el desarrollo de este proyecto: se realizaron fermentaciones en leche, suero de leche y caseínas, con *Lactobacillus casei* y *Streptococcus thermophilus*; se monitoreo el pH, el crecimiento y se

determinaron los grupos amino terminales, se identificaron péptidos por su peso molecular y se determinó el porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (actividad antihipertensiva). Enseguida se discuten los resultados obtenidos; y por último se encuentran las conclusiones.

2. Antecedentes

2.1. Péptidos Bioactivos

Los alimentos funcionales, también llamados nutracéuticos o alimentos farmacéuticos, son aquellos en los que se ha demostrado satisfactoriamente que tienen un efecto benéfico, en una o más funciones en el ser humano, además de los efectos nutricionales, de manera que pueden mejorar la salud o reducir los riesgos de enfermedad (Mollet y Rowland, 2002). El mercado de los alimentos en este aspecto ha aumentado, el consumidor busca cada vez más aspectos que mejoren su salud y no solo los beneficios implícitos en un alimento.

Para poder desarrollar este tipo de productos es necesario entender el funcionamiento de los ingredientes activos; la generación de estos ingredientes es un aspecto también de amplio estudio. Las leches fermentadas por probióticos, es uno de los ejemplos claros de este tipo de alimentos (Mollet y Rowland, 2002). Los péptidos bioactivos también han sido estudiados y se han encontrado una gran variedad de éstos con diversas funciones.

Un péptido es una molécula con una secuencia pequeña de aminoácidos, unidos entre si por enlaces peptídicos. Éstos han sido identificados dentro de la secuencia de aminoácidos en las proteínas de la leche (Schanbacher *et al*, 1997) y de varios alimentos. Los péptidos que se encuentran inactivos dentro de la secuencia de las proteínas pueden ser liberados durante la hidrólisis de las proteínas, por ejemplo durante la digestión gastrointestinal de los alimentos o durante el procesamiento de éstos. Los péptidos generados pueden presentar diversas funciones bioactivas (Meisel, 1997).

Los péptidos bioactivos pueden influenciar directamente muchos procesos biológicos como el funcionamiento gastrointestinal, hormonal, inmunológico, neurológico y nutricional; éstas funciones pueden ser aprovechadas de muchas formas: como fármacos o como complementos en alimentos, en este último caso (nutracéuticos), mejorando la salud del consumidor. Muchos de estos péptidos tienen capacidades multifuncionales, y es común que compartan patrones estructurales basados en un papel bioespecífico definido (Clare y Swaisgood, 2000). Debido a sus múltiples efectos se pueden clasificar según su actividad biológica.

2.1.1. Péptidos antimicrobianos

Se ha reportado la presencia en la leche de glicopéptidos con actividad bactericida contra varias cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus*. En general, no se había dado un gran interés en desarrollar tales productos, aunque recientemente se ha renovado el interés por estos péptidos en la industria de la salud.

La caseidina, un péptido derivado de la caseína, ha demostrado tener actividad en contra de *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*. La isracidina, un segmento N-terminal de α_{s1} -caseína, ha protegido ratones contra *Staphylococcus* y *Candida albicans*. Las proteínas de la leche también contienen péptidos con actividad antifúngica. En la tabla 2.1 se muestran estos péptidos (Clare y Swaisgood, 2000).

Tabla 2.1 Péptidos de leche con actividad antimicrobiana.				
Péptido	Proteasa liberadora	Actividad en Gram (+)	Actividad en Gram (-)	Levaduras y Hongos
Caseidina	Quimosina y quimotripsina	<i>Staphylococcus sp.</i> <i>Sarcina sp.</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Diplococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>		
Casocidina-I	Péptido sintético	<i>Staphylococcus carnosus</i>	<i>Escherichia coli</i>	
Isracidina	Quimosina y quimotripsina	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Candida albicans</i>
Lactoferrina B Lactoferrina f(17-41)	Pepsina	<i>Bacillus sp.</i> <i>Listeria sp</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Staphylococcus sp.</i>	<i>E. coli</i> 0111 <i>E. coli</i> 0157H:7 <i>Klebsiella sp.</i> <i>Proteus sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Salmonella sp.</i>	<i>Candida albicans</i> Dermatofitos: - <i>Cryptococcus uniguttulatus</i> - <i>Penicillium pinophilum</i> - <i>Tricophyton mentagrophytes</i>

La lactoferrina es una proteína del suero de la leche, su fragmento 17-41 puede ser liberado dando origen a la llamada lactoferrina; ésta presenta actividad bacteriocida. Una característica de ésta es la relativamente alta proporción de sus residuos de aminoácidos básicos y su arreglo asimétrico en el péptido; parece que su actividad está correlacionada con la carga positiva neta que presenta; el arreglo asimétrico de sus aminoácidos básicos ha sido observado en varios péptidos que muestran afinidad por las

membranas biológicas. Estos péptidos catiónicos atacan a microorganismos sensibles incrementando la permeabilidad de sus membranas (Meisel, 1997).

2.1.2. Péptidos antihipertensivos

La hipertensión es un problema de salud a nivel mundial y es uno de los mayores riesgos controlables asociados con las enfermedades cardiovasculares. Varios estudios sugieren una importante disminución del desarrollo de hipertensión mediante una dieta rica en péptidos inhibidores de ACE (Hong *et al*, 2008). Los péptidos inhibidores de ACE tienen una actividad menor a la de los fármacos inhibidores de ACE, sin embargo, no tiene ningún efecto secundario y son más económicos.

El control de la presión sanguínea está asociado al sistema renina-angiotensina. La renina convierte el angiotensinógeno del hígado en el decapeptido angiotensina I, que a su vez por medio de la actividad proteolítica de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) resulta en un octapéptido: angiotensina II, el cual es un potente vasoconstrictor. La angiotensina II incrementa la presión arterial, la retención de sodio y de líquidos. En el sistema cinina-caliceína, ACE degrada el vasodilatador bradiquinina, el cual es depresor de la presión arterial.

Los primeros inhibidores exógenos de ACE con un efecto *in vivo* antihipertensivo fueron descubiertos en veneno de serpiente; posteriormente se encontraron varios inhibidores en hidrolizados enzimáticos de proteínas presentes en alimentos, como caseína, suero, gelatina, levadura y maíz. Los péptidos inhibidores de ACE son los más comunes en las proteínas de los alimentos (Pihlanto y Korhonen, 2003).

La relación estructura-actividad existente entre diferentes péptidos inhibidores, indica que la unión a la ACE está influenciada por la secuencia del tripéptido C-terminal del sustrato; estas relaciones todavía no se entienden por completo, parece que la enzima prefiere sustratos o inhibidores competitivos que contienen residuos de aminoácidos hidrofóbicos en las tres últimas posiciones del extremo C-terminal. Muchos de los péptidos inhibidores conocidos contienen residuos de prolina, lisina o arginina en dicho extremo. Por otra parte, Meisel (1997) propone que el mecanismo de inhibición de ACE presenta una interacción del inhibidor con un sitio de unión aniónico; esto explica que la carga positiva de los residuos de arginina y lisina presenten una mayor actividad antihipertensiva.

La leche ácida Calpis® (Calpis Co. Ltd. Tokio, Japan) presenta dos potentes inhibidores de ACE, los tripéptidos Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro. Éstos son originados a partir de la caseína durante la fermentación de la leche con *Lactobacillus helveticus* y *Sacharomyces cerevisiae*. Algunas variedades de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* han sido usadas para producir leches fermentadas que contengan péptidos inhibidores de ACE (Hernández-Ledesma *et al*, 2005).

2.1.3. Péptidos antitrombótico

Una hemostasis normal de las arterias requiere una cuidadosa regulación de las interacciones entre la pared del vaso y los constituyentes de la sangre. Una ruptura del endotelio de la superficie vascular puede resultar en la formación de un trombo oclusivo. El daño y la mortalidad resultante de las manifestaciones clínicas de un trombo pueden ser infarto al miocardio e isquemia cerebrovascular; esto ha provocado la búsqueda de agentes antitrombóticos efectivos (Schaffer *et al*, 1991).

La formación de trombos arteriales es iniciada por la adhesión de plaquetas al subendotelio dañado, la activación de las plaquetas y la agregación de plaquetas mediado por el fibrinógeno. La exposición de la superficie del subendotelio resulta en la activación de la cascada de coagulación.

Se han descubierto ciertas similitudes entre la coagulación de leche y de la sangre, así como homología en las secuencias entre la cadena κ y del fibrinógeno y la κ -caseína. La hidrólisis de la κ -caseína bovina con quimosina es la primera etapa de la coagulación de la leche, en esta reacción la unión entre la F₁₀₅-M₁₀₆ de la κ -caseína es hidrolizado, dando como resultado la fracción para κ -caseína f(1-105) y el fragmento soluble del C-terminal f(106-169); de este último fragmento se han obtenido péptidos con actividad sobre el funcionamiento de las plaquetas (Pihlanto y Korhonen, 2003). El undecapéptido correspondiente a la κ -caseína bovina f(106-116) (Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Gln-Asp-Lys) (Jolles *et al* 1986), inhibe la agregación plaquetaria inducida por adenosin difosfato (ADP) y se combina con el receptor del fibrinógeno; en consecuencia previene la unión del fibrinógeno con las plaquetas. Otros péptidos más pequeños presentan una baja actividad sobre la agregación plaquetaria y no inhiben la unión del fibrinógeno. Esta actividad se ha medido en modelos animales y se han dado resultados positivos.

Jackson *et al* (1992) estudiaron el péptido metil Phe-Pro-Arg; los resultados de

dicha investigación muestran que este péptido es un inhibidor del sitio activo de la trombina reversible y competitivo; éste es muy efectivo como agente anticoagulante y antitrombótico. Fue probado en un modelo de trombosis coronaria en perros y se observó la inhibición de la trombina y la inducción selectiva de la agregación plaquetaria. Este es un ejemplo exitoso de la investigación de alternativas para el tratamiento de la hipertensión.

2.1.4. Péptidos acarreadores de minerales

La mayoría de los caseinofosfopéptidos (CPP) contienen 3 grupos de serina, seguidos por dos residuos de ácido glutámico, estos forman sales solubles organofosfatadas. Funcionan como acarreadores de minerales principalmente calcio. Los CPP son muy resistentes a la hidrólisis en las vísceras y comúnmente se hallan unidos con fosfatos de calcio; esto hace que sean muy solubles, provocando un aumento en la absorción de calcio en el intestino delgado. En condiciones fisiológicas proveen calcio para la calcificación de los huesos y también inhiben lesiones por caries, por medio de la recalcificación dental (Clare y Swaisgood, 2000).

Los CPP acarreadores de minerales corresponden a diferentes regiones fosforiladas de α_{s1} -, α_{s2} -, β - y k -caseína (Tabla 2.2). Las cadenas laterales cargadas negativamente de residuos fosforilados son el sitio de unión aniónico; sin embargo, diferentes fracciones de fosfopéptidos de caseína tienen diferencias importantes en su actividad acarreadora de calcio; esto puede ser atribuido a la influencia de algunos aminoácidos cercanos al sitio de unión fosforilado (Meisel, 2004).

Tabla 2.2 Secuencias fosforiladas en caseínas bovinas *		
Caseína	Residuo	Secuencia de aminoácidos
α_{s1} -	59-79	QMEAEΣΙΣΣΣEEIVPNΣVEQK
	112-119	VPNΣAEER
α_{s2} -	5-8	EHVSSΣΣEEΣIIΣQE
	29-34	NPΣKEN
	55-64	GΣΣΣEEΣΣAEV
	127-147	QLΣTΣEEENSKKTVDMEΣTEVF
β -	12-23 variante A	IVEΣLΣΣΣEEΣI
	12-23 variante D	IVEΣLΣKΣEEΣI
k -	147-153	EAΣPEVI

Se uso el código de aminoácidos de una letra, fosfoserina = Σ.

*(Meisel y FitzGerald, 2003).

En pruebas *in vitro* los CPP han demostrado prevenir la precipitación de calcio en la presencia de fosfatos y condiciones alcalinas; se han utilizado varios métodos para medir la unión de los CPP con el calcio: quelación con resinas, electrodos selectivos de calcio, absorción atómica y electroforesis capilar de zona; las constantes de unión al calcio reportadas varían entre 10^{-2} - 10^{-3} M⁻¹ y 0.32 mM⁻¹. Se han llevado a cabo un número limitado de estudios en humanos de la contribución de los CPP a la disponibilidad del calcio; en un estudio realizado en mujeres posmenopáusicas con una capacidad basal de absorción de calcio baja, se observó un aumento en la absorción de calcio durante la ingesta simultánea de calcio y CPP (Meisel y FitzGerald, 2003).

Debido a que los CPP pueden unirse y solubilizar minerales, se ha pensado que estos pueden tomarse en cuenta como ingredientes en alimentos funcionales, en una dieta que requiera la suplementación de calcio, magnesio y hierro. Estos minerales son necesarios para un metabolismo adecuado, y una ingesta adecuada puede ayudar a prevenir enfermedades como la osteoporosis, hipertensión y anemia (Meisel y FitzGerald, 2003).

2.1.5. Péptidos inmunomoduladores

Los péptidos inmunomoduladores afectan el sistema inmune y la respuesta de proliferación celular. Péptidos obtenidos por medio de la hidrólisis de caseína, han demostrado aumentar la actividad fagocítica en macrófagos humanos contra los eritrocitos viejos. También se sabe que algunos pequeños péptidos correspondientes al extremo N-terminal de α -lactoalbúmina y k-caseína bovinas, incrementan la proliferación de los linfocitos de sangre periférica significativamente. Actualmente se sabe que los péptidos bioactivos del yogurt disminuyen la proliferación celular (células cancerosas), esto puede explicar por que el consumo de yogurt ha sido asociado con la reducción de la incidencia de cáncer de colon (Clare y Swaisgood, 2000).

Los inmunopéptidos derivados de la caseína que incluyen fragmentos de la α_{s1} -caseína y β -caseína estimulan la fagocitosis en los glóbulos rojos de oveja y aumenta el efecto de protección contra *Klebsiella pneumoniae* en ratones después de administrarse via intravenosa. Los péptidos Tyr-Gly y Tyr-Gly-Gly glicina aumentan significativamente la proliferación y la síntesis de proteínas en los linfocitos de sangre periférica (Meisel y FitzGerald, 2003).

Los mecanismos moleculares por los cuales algunos péptidos presentan efectos inmunomoduladores, no han sido definidos. Se sabe que los linfocitos y macrófagos tienen receptores para muchos mediadores biológicamente activos. La actividad inmunoestimuladora que presentan algunos CPP es atribuida a sus residuos de fosfoserina. Los resultados obtenidos con linfocitos humanos, sugieren que los péptidos opioides pueden afectar la inmunorreactividad de los linfocitos por vía del receptor opioide (Meisel y FitzGerald, 2003). Se ha sugerido que péptidos originados en la caseína están relacionados con la estimulación del sistema inmune de recién nacidos (Fiat *et al*, 1993). Los péptidos inmunomoduladores pueden contribuir a una gran respuesta inmunoestimuladora; esto puede resultar en una mejora en la función inmunológica.

2.1.6. Péptidos opioides

Los péptidos opioides se pueden clasificar como: opioides agonistas, que son péptidos que presentan una afinidad por un receptor opioide y un efecto similar al de otros opioides como la encefalina, que se inhiben por la naloxona; y opioides antagonistas, que suprimen los efectos de agonistas como la encefalina, y presentan un efecto análogo a la naloxona (Clare y Swaisgood, 2000).

Las β -casomorfina son péptidos opioides, originados a partir de la β -caseína (Tabla 2.3). Estos péptidos han demostrado presentar actividad opioide en pruebas con receptores opioides y en pruebas con preparaciones de órganos aislados. Las casomorfina modulan el comportamiento social y presentan funciones analgésicas, prolongan el tiempo de tránsito gastrointestinal porque inhiben la peristalsis y la motilidad intestinal; es decir, que presentan un efecto antidiarreico (Pihlanto y Korhonen, 2003).

Los derivados opioides de la α -caseína son llamados exorfinas, y han sido liberados después de digestión con pepsina a partir de caseína bovina; han presentado propiedades opioides en pruebas in vitro: unidos a receptores opioides de cerebros de ratas e inhibiendo las contracciones en preparaciones de ratas *vas deferens* eléctricamente estimuladas. Los péptidos con funciones opioides también juegan papeles importantes en la modulación del apetito ya que modifican la actividad endocrina del páncreas, produciendo un aumento de la secreción de insulina (Pihlanto y Korhonen, 2003).

Derivados de la k-caseína presentan una baja, pero clara, actividad opioide antagonista; éstos son las llamadas casoxinas. Se ha observado que estando metilados en un extremo y presentando un residuo básico, como la arginina, en el extremo opuesto, éstos presentan una preferencia por los k-receptores. Los péptidos derivados de las proteínas del suero de la leche son llamados: α -lactorfina derivada de la α -lactoalbúmina y la β -lactorfina derivada de la β -lactoglobulina. La α -lactorfina presenta actividad opioide baja pero consistente en el ileum de cerdos de guinea (Clare y Swaisgood, 2000).

Proteína precursora	Fragmento	Nombre	Actividad
β -caseína	60-66	β -casomorfina 7	Agonista
α_{s1} -caseína	90-96	Exorfina de α -caseína	Agonista
k-caseína	33-38	Casoxina 6	Antagonista
	25-34	Casoxina C	Antagonista
A-lactoalbúmina	50- 53	α -lactorfina	Agonista
B-lactoglobulina	102-105	β -lactorfina	Agonista

*(Pihlanto y Korhonen, 2003)

2.1.7. Péptidos antioxidantes

El metabolismo oxidativo es esencial para la sobrevivencia de las células, sin embargo éste provoca la producción de radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno. Estos compuestos participan en el envejecimiento y en varias enfermedades como el cáncer, inflamación, en la toxicidad de varios compuestos; cuando un exceso de radicales libres es formado, pueden sobrepasar la capacidad de las enzimas como la superoxido dismutasa, catalasa y peroxidasa; esto puede resultar en efectos destructivos y letales para la célula. En el caso de los alimentos la peroxidación de los lípidos causa deterioro en la calidad de los alimentos: sabor a rancio, sabor desagradable y se acorta su vida de almacén (Hernández-Ledesma *et al*, 2005).

Para prevenir el deterioro de los alimentos y contrarrestar la pérdida de defensas contra el estrés oxidativo, es importante inhibir la peroxidación de los lípidos y la formación de radicales libre en el ser humano y los alimentos. Los agentes antioxidantes pueden prevenir la oxidación lipídica; la búsqueda de antioxidantes naturales, como alternativas a los sintéticos, es un tema de gran interés actualmente.

Antioxidantes seguros de fuentes naturales, principalmente compuestos no proteicos de plantas, han sido encontrados. Algunas proteínas de ciertos alimentos han sido mencionadas como capaces de unirse al sitio activo de las especies activas de oxígeno. Varios hidrolizados de proteínas de algunos alimentos, contienen péptidos que presentan actividad antioxidante (Pihlanto, 2006).

La habilidad de los hidrolizados de proteína de inhibir cambios causados por la oxidación lipídica, parece estar relacionada a la naturaleza y composición de las diferentes fracciones peptídicas producidas. El péptido Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu, tiene actividad contra el radical anión superóxido; el extremo C- terminal (Glu-Leu) es importante para esta actividad (Pihlanto, 2006).

Hernández-Ledesma *et al* (2005), encontraron que el péptido Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ala-Ser-Asp-Ile, derivado de la β -lactoglobulina, posee una alta actividad sobre radicales libres, mayor aún que el butilato de hidroxianisola (BHA), un antioxidante sintético.

2.2. Producción de péptidos bioactivos

Todas estas funciones representan una gran plataforma para el desarrollo de nuevos productos nutracéuticos y farmacéuticos, por ejemplo, ya se tienen procesos a escala industrial, para la recuperación de proteínas no desnaturalizadas, biológicamente activas, que se producen directamente en la manufactura del queso. Las caseínas pueden ser aisladas en el procesamiento de la leche, durante la elaboración de productos lácteos; se cree que es económicamente posible recuperarlas e hidrolizarlas, para producir péptidos bioactivos. Ésta puede ser una forma de explotar las diferentes funciones de estos péptidos. Se han propuesto otras formas de producción, una es aprovechar el sistema proteolítico que poseen una gran variedad de microorganismos, en especial las bacterias ácido lácticas (Korhonen y Pihlanto, 2005).

Péptidos biológicamente activos se pueden producir básicamente de tres formas: 1) por medio de la acción de enzimas digestivas, es decir hidrólisis enzimática; 2) durante el procesamiento de los alimentos; 3) proteólisis por enzimas de plantas o microorganismos. También se puede usar la combinación de éstos métodos.

La proteólisis por microorganismos puede darse como parte del procesamiento de los alimentos, la fermentación de la leche es uno de estos casos. Muchos de los cultivos

lácteos usados en la industria son altamente proteolíticos; debido a esto péptidos bioactivos pueden ser generados por el sistema proteolítico de bacterias durante la manufactura de productos lácteos fermentados (Korhonen y Pihlanto, 2006). Existen varios ejemplos de péptidos bioactivos liberados de las proteínas de la leche por medio de la proteólisis microbiana (Gobbetti *et al*, 2000; Hernandez-Ledesma *et al*, 2005; Matar *et al*, 1996).

2.2.1. Fermentación de leche.

Los beneficios a la salud de la leche fermentada han sido reconocidos y documentados desde hace mucho, la actividad benéfica de los productos lácteos fermentados siempre ha sido relacionada a los microorganismos vivos que se encuentran en ellos. Las bacterias ácido lácticas como ya se ha mencionado, son usadas ampliamente en la industria de los lácteos; la fermentación de la leche tiene efecto positivo en la liberación de los péptidos. Normalmente al consumir leche, gran parte de las proteínas son degradadas en la digestión, originando péptidos, muchos de ellos bioactivos, esto ha sido documentado en varias situaciones (Schanbacher *et al*, 1997), pero cuando se toma leche fermentada, el resultado de la digestión es un número mayor de estos péptidos.

El procesamiento de alimentos como ya se mencionó, puede liberar péptidos bioactivos; la manufactura de productos lácteos es un ejemplo de esto. Muchos cultivos iniciadores usados en la industria son altamente proteolíticos. Los péptidos bioactivos pueden ser generados por bacterias iniciadoras o no iniciadoras, usadas en la manufactura de varios productos lácteos. El sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas ha sido ampliamente estudiado. Este sistema se compone de proteinasas unidas a la pared celular, distintas peptidasas intracelulares incluyendo endopeptidasas, aminopeptidasas, tripeptidasas y dipeptidasas. Se sabe que la actividad de dichas peptidasas se ve afectada por las condiciones de crecimiento; esto hace posible manipular la formación de péptidos. La mayoría de los péptidos bioactivos producidos durante la fermentación de leche son inhibidores de ACE, inmunomoduladores, antioxidantes y antimicrobianos (Tabla 2.4) (Fitzgerald y Murray, 2006).

Matar *et al* (1996), realizaron un estudio, en el cual evaluaron los beneficios de la fermentación para la liberación de péptidos bioactivos. Durante la fermentación de la leche con una bacteria ácido láctica (*Lb. helveticus*), la proteólisis de manera regular es pequeña y solo hidroliza entre un 1 y un 2% de las proteínas; sin embargo, Schlimme *et*

al (1990) han reportado que cantidades muy pequeñas de péptidos liberados son suficientes para presentar actividad fisiológica. La fermentación de la leche antes de su consumo favorece la modificación estructural de las proteínas, produce varios oligopéptidos precursores de péptidos y consecuentemente facilita la liberación de éstos durante la digestión.

Tabla 2.4 Ejemplos de péptidos bioactivos liberados de proteínas de la leche por varios microorganismos*

Microorganismo	Proteína precursora	Secuencia peptídica	Bioactividad
<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	β -caseína, κ -caseína	VPPIPP	Inhibidor ACE
<i>Lactobacillus helveticus</i> CP 90	β -caseína	KVLPVLQ	Opioide, Inhibidor ACE, inmunoestimulador
<i>Lactobacillus helveticus</i> CPN 4	Proteínas del suero	YP	Inhibidor ACE
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. bulgaricus SS1, <i>Lactococcus lactis</i> subsp. cremoris FT4	β -caseína, κ -caseína	Varios fragmentos	Inhibidor ACE
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. bulgaricus IFO13953	κ -caseína	ARHPHPLSFM	Antioxidante
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. bulgaricus	β -caseína	SKVYP	Inhibidor ACE
<i>Streptococcus thermophilus</i> + <i>Lactococcus lactis</i> subsp. lactis biovar. diacetylactis	β -caseína	VPPIPP	Inhibidor ACE

*Korhonen y Pihlanto, 2006.

2.3. Proteínas de la leche

Las proteínas en las que se pueden encontrar péptidos bioactivos pueden ser de orígenes diversos (huevo, leche, plantas, etc.); la leche es una de las fuentes de péptidos bioactivos más investigadas (Pihlanto y Korhonen, 2003). La leche es un líquido segregado por las glándulas mamarias de hembras sanas, poco después del calostro, cuando nace la cría. Su función principal es la de alimentar a las crías en el periodo crítico posterior al nacimiento. La leche presenta varios componentes con funcionalidad fisiológica, entre los que destacan los péptidos bioactivos encriptados en sus proteínas (Shah, 2000).

Las proteínas de la leche son un gran grupo de proteínas grandes y pequeñas. La mayoría son sintetizadas en el epitelio secretor de la glándula mamaria. Estas pueden dividirse en dos grandes grupos: caseínas y proteínas del suero. Esta clasificación se da debido a su comportamiento frente a agentes precipitantes. En la tabla 2.5. se muestra la composición de dichas proteínas en la leche y algunas de las funciones biológicas descritas por Sindayikengera y Wenshui (2005).

Las caseínas precipitan cuando la leche se ha acidificado hasta un pH de aproximadamente 4.6, sin embargo, las proteínas del suero siguen en solución. La leche de rumiantes contiene 4 tipos de caseínas: α_{s1} -caseínas, α_{s2} -caseínas β -caseínas y κ -caseínas. Las γ -caseínas son producto de la ruptura de la β -caseína por la plasmina, enzima proteolítica de la leche. En la leche las moléculas de caseína se presentan en micelas. Las micelas son estructuras esféricas formadas de varios miles de moléculas de caseína unidas entre si; éstas encapsulan cantidades importantes de calcio, fosfato y cantidades menores de citrato (Stelwagen, 2002).

Las principales proteínas del suero sintetizadas por las glándulas mamarias de rumiantes son la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina. Además de estas proteínas, el suero también contiene un gran número de proteínas pequeñas que son tomadas de la sangre; éstas son llevadas a la leche sin ningún procesamiento intermedio; entre ellas se encuentran: inmunoglobulinas, lactoferrina y seroalbúmina (Stelwagen, 2002).

Proteína	Concentración (g/L)	% Total de proteínas de leche	Funciones biológicas sugeridas*
Proteínas totales	30-35	100	
Caseínas	24-28	76-86	
α_{s1} -caseína	12-15	33	Precursoras de péptidos bioactivos
α_{s2} -caseína	3-4	9	
β -caseína	9-11	25	
κ -caseína	3-4	9	
Proteínas del suero	5-7	14-24	
β -lactoglobulina	2-4	9	Acarreadora de retinol, liga ácidos grasos y precursora de péptidos bioactivos
α -lactoalbúmina	1-1.5	3.5	Síntesis de lactosa, acarreadora de Ca^{2+} , precursora de péptidos bioactivos
seroalbúmina	0.1-0.4	1	Precursora de péptidos bioactivos y liga ácidos grasos
lactoferrina	0.1	<1	Acción antimicrobiana, transportadora de hierro y precursora de péptidos bioactivos
inmunoglobulinas	0.6-1	3	Protección inmunespecífica
proteosa peptona	0.6-1.8	2	Acarreadora potencial de minerales

*(Sindayikengera y Wenshui, 2005)

Las proteínas de la leche son un grupo completamente heterogéneo, no solo entre categorías sino dentro de las mismas categorías, esto es claro, si simplemente observamos que el rango de peso molecular va de los 10 a los 1000 kDa; la composición

de aminoácidos y su secuencia también presenta diferencias; éstas son las que determinan, finalmente, sus propiedades fisicoquímicas y estructura. El grado de modificación postraducciona (proteólisis, fosforilación, glicosilación, formación de puentes disulfuro), y la existencia de variantes genéticas también contribuyen a su heterogeneidad (Ng-Kwai-Hang, 2002).

2.3.1. Caseínas

La leche bovina contiene cinco tipos de caseínas: α_{S1} -caseínas, α_{S2} -caseína, β -caseína, κ -caseína y γ -caseína. Estas proteínas son similares entre sí, y cada una es diferente a proteínas de otras clases. En la leche fresca las caseínas están presentes en partículas esféricas: las micelas de caseína, en las que se agrupan un gran número de moléculas de proteína. Su tamaño varía de 15 a 1000 nm de diámetro. Con excepción de la κ -caseína que parece estar mayormente en la superficie externa de la micela, las demás caseínas están distribuidas de forma homogénea dentro de la micela.

α_{S1} -caseína: presenta un peso molecular de 23 kDa, y posee 199 residuos de aminoácidos. Esta proteína tiene la carga neta negativa más alta de todas las caseínas en un medio con pH neutro, y tiene una hidrofobicidad calculada de 4.9. Su hidrofobicidad es mayor cerca de los residuos 25,90-110 y 140-190, y cerca del extremo C-terminal. Presenta una región ácida entre los residuos 38 y 78; ésta es responsable de la unión al calcio. Presenta un bajo nivel de α -hélices y de hojas β .

α_{S2} -caseína: tiene un peso molecular de 25 kDa y la forman 207 residuos de aminoácidos. Ésta es el menor componente de las caseínas y es también el menos hidrofóbico (4.6). Es la más fosforilada de las caseínas. Presenta tres regiones con fosfopéptidos: 5-18, 49-68 y 126-145; tiene dos grandes regiones hidrofóbicas: 90-120 y 160-207; esta proteína presenta varios sitios donde puede ser hidrolizada por la plasmina. En la leche una proporción de ésta existe como un dímero unido por puentes disulfuro.

β -caseína: el peso molecular de esta proteína es de 24 kDa, y esta compuesta de 209 residuos de aminoácidos. Ésta es uno de los componentes principales de las caseínas y es el más hidrofóbico (5.6): tiene la región más larga de alta hidrofobicidad (55-90 y 130-209); su región N-terminal (24 aminoácidos) es ácida. Presenta dos sitios donde la plasmina puede actuar. En solución neutral a temperatura ambiente y de baja fuerza iónica, la β -caseína presenta muy baja estructura secundaria. El efecto de la temperatura sobre los residuos de triptófano y la hidrofobicidad indican que los cambios

en hidrofobicidad y estructura debidos al medio, son consecuencia de la asociación de las proteínas.

k-caseína: su peso molecular es de 19 kDa y consta de 169 residuos de aminoácidos. Esta proteína constituye el 10-12 % de toda la caseína; juega un papel muy importante como estabilizador de las micelas de caseína. El extremo N-terminal (1-95) presenta una carga neta positiva, es muy hidrofóbica e interactúa fuertemente con las otras moléculas de caseína. El extremo C-terminal (113-169) tiene una carga neta negativa y contiene en su mayoría residuos polares. Esta proteína puede ser hidrolizada para resultar en dos moléculas: un péptido grande, hidrofóbico y un péptido pequeño, hidrofílico llamado glicomacropéptido.

La caseína puede ser aislada de la leche desestabilizando la suspensión de micelas, o por fraccionamiento según su tamaño; toda la caseína se puede separar y dar varias fracciones puras de caseínas. Cada caseína tiene secuencia diferente, de tal manera, presenta diferentes propiedades frente a las otras caseínas; dentro de cada grupo de caseínas hay diferentes especies de proteína. La microheterogeneidad es causada por diferentes niveles de fosforilación postraduccional de serinas, en casos especiales treoninas, la glicosilación de residuos de treonina, la sustitución de aminoácidos por variaciones puntuales de los genes, por proteólisis, y por puentes disulfuro.

A diferencia de las proteínas globulares, la estructura tridimensional de las caseínas no puede ser determinada por cristalografía de rayos X, porque no se puede cristalizar; tampoco se puede usar espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), porque no es posible disolverla en una concentración alta. Se ha tratado de predecir su estructura, determinando estructuras peptídicas por espectroscopia de RMN y por medio de estudios fisicoquímicos.

Una característica importante de las caseínas son las fuertes interacciones que presentan entre sí bajo condiciones fisiológicas, y el efecto que los cationes divalentes tienen sobre sus interacciones y estabilidad a pH neutro. Estas propiedades son reflejadas en la alta viscosidad de las soluciones de caseínas, así como en su habilidad de formar espuma y emulsiones; esto es de gran importancia para su funcionalidad en productos comerciales (Creamer, 2002).

2.3.2. Proteínas del suero

La fracción del suero de la leche contiene una mezcla compleja de proteínas; las principales proteínas encontradas en el suero de leche son: β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, glicomacropéptido (si el suero es producido por coagulación enzimática), seroalbúmina, inmunoglobulinas, lactoferrina y lactoperoxidasa. Cada uno de estos grupos de proteínas o proteínas presentan alguna propiedad funcional, nutricional o nutracéutica (Foegeding y Luck, 2002).

Además de ser una buena fuente de nitrógeno, las proteínas del suero actúan como acarreadoras de ligandos y elementos traza, y presentan varias funciones biológicas; las principales proteínas, la β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, son conocidas por presentar varias propiedades funcionales, que se pueden emplear en diversas aplicaciones. En la leche de vaca, la concentración de las proteínas del suero es de entre 4 y 7 g/L, en comparación con las caseínas (28g/L), es un valor bajo. Las proteínas del suero tienen un valor nutricional alto, debido a la variedad de aminoácidos que presentan y a su buena digestibilidad. Son un grupo muy heterogéneo de proteínas, que permanecen en el suero después de la precipitación de las caseínas.

Se han descrito amplios beneficios al tener una dieta en la que esté presente las proteínas del suero de leche: inhibición de la formación de tumores en el colon y en el tracto gastrointestinal, prevención de cáncer intestinal, etc. Se ha sugerido que el efecto protector de una dieta con concentrados de proteínas de suero, puede ser debido a que las proteínas del suero aumentan la concentración de glutathione en el tejido, ya que el suero de leche es rico en sustratos para la síntesis de glutathione. La presencia del glutathione en los tejidos, se ha sugerido como la responsable de la disminución del desarrollo de tumores en varias partes del cuerpo, ya que posiblemente éste reduzca los radicales libres, que pueden dañar el ADN cromosomal (Pihlanto y Korhonen, 2003).

α -lactoalbúmina: la cadena polipeptídica de esta proteína contiene 123 residuos de aminoácidos, incluyendo ocho cisteínas, que se encuentran unidas covalentemente, formando cuatro puentes disulfuro. Su peso molecular es de 14.2 kDa. La α -lactoalbúmina de diversos mamíferos es similar en tamaño, y todas son proteínas aniónicas. Todas las α -lactoalbúminas conocidas contienen un ion calcio, fuertemente unido; esto influencia la estabilidad y estructura. Al remover el ion de calcio la estabilidad de la proteína se reduce. A temperatura ambiente y en solución con una baja fuerza iónica, la apoproteína (forma sin calcio), cambia su forma tridimensional a una forma

globular, de esta manera la proteína mantiene su estructura secundaria, pero no tiene una estructura terciaria fija (Zhang y Breu, 2002).

β -lactoglobulina: tiene una secuencia de 162 aminoácidos y un peso molecular de 18 kDa. Ésta está presente en la leche de la mayoría de los mamíferos, generalmente representa el 50% de las proteínas del suero en rumiantes, y el 10% del total de proteínas en la leche de vaca. La β -lactoglobulina es globular; en estado natural su estructura tridimensional tiene α -hélices en uno de sus extremos; en la leche de rumiantes existe como un dímero entre pH de 3 y 7. La función biológica de estas proteínas no se tiene clara aún, y la ausencia de ésta en la leche de algunos mamíferos, sugiere que puede no ser esencial para muchas especies. La β -lactoglobulina existe en un gran número de variantes. Se ha vuelto un valioso ingrediente de algunos alimentos, como el mayor componente de los concentrados de suero de leche, (Creamer y Sawyer, 2002).

Seroalbúmina: en su secuencia contiene 582 residuos de aminoácidos, su peso molecular es de 66.4 kDa. Su estructura contiene 17 puentes disulfuro, lo que sostiene a la molécula en una estructura de 9 vueltas. La estructura terciaria esta compuesta de tres dominios globulares de igual tamaño; cada uno contiene tres vueltas estabilizadas por los puentes disulfuro; se sabe que cada dominio consiste en dos subdominios. La seroalbúmina bovina es la proteína más abundante en el sistema circulatorio constituye aproximadamente el 50 % de la proteína en el suero de la sangre de la vaca. Esta proteína es responsable del 80 % de la presión osmótica de la sangre y es la mayor responsable de la estabilización del pH en la sangre. La seroalbúmina actúa como una excelente reserva proteica y funciona como una proteína transportadora, con una amplia variedad de ligandos: ácidos grasos de cadena larga, hormonas esteroides, bilirrubina e iones metálicos (Haggarty, 2002).

Lactoferrina: esta formada por una cadena polipeptídica de 700 residuos de aminoácidos. La lactoferrina bovina presenta un peso molecular 80 kDa. También es llamada lactotransferrina. Es una glicoproteína que puede unirse al hierro; cada molécula de esta proteína puede unirse a dos iones de hierro. La unión al hierro que ésta presenta es muy fuerte, se mantiene aún en condiciones ácidas (pH 3). En estado natural tiene un color rosa salmón, el cual depende del grado de saturación de hierro que presente. Puede, aparte de ligarse al hierro, unirse a algunos otros iones metálicos como: cobre, cobalto, zinc y manganeso. Todos los mamíferos parecen poder producir esta proteína en la leche, aunque su concentración varía según la especie (Korhonen y Marnila, 2002).

Inmunoglobulinas: la estructura básica de estas proteínas es similar entre los diferentes tipos existentes; están compuestas por dos cadenas pequeñas idénticas (el peso molecular de cada una es de 23 kDa) y dos cadenas grandes también iguales (cada una con peso molecular de 53 kDa). Hay dos tipos de cadenas pequeñas (κ y λ) diferentes en la estructura de su cadena, pero tienen secuencias de aminoácidos homólogas. La molécula de inmunoglobulina completa tiene un peso molecular de 160 kDa. Las inmunoglobulinas están presentes en la leche y el calostro de todas las especies lactantes. La función biológica de las inmunoglobulinas es dotar al recién nacido de protección inmunológica contra microorganismos patógenos y toxinas, y proteger la glándula mamaria de infecciones; el mecanismo usado para este fin es aumentar la fagocitosis y las reacciones citotóxicas mediadas por las células de leucocitos, aglutinación de bacterias, neutralización de microbios y toxinas. Estas proteínas están divididas en grupos; éstos tienen diferencias en su estructura fisicoquímica. Las principales en la leche humana y bovina son las: A, G y M (Marnila y Korhonen, 2002).

2.4. Bacterias ácido lácticas

Muchos alimentos como yogurt, queso, salami y vinos son el producto de fermentaciones por bacterias ácido lácticas (BAL). Muchas especies de BAL y algunas otras bacterias son asociadas históricamente a la comida, son reconocidas como bacterias “generalmente consideradas como seguras” (GRAS, por sus siglas en inglés); es importante mencionar, que no necesariamente cualquier BAL puede ser reconocida así (Limsowtin *et al*, 2002).

La propiedad clave que define a las BAL, es que estas bacterias producen ácido láctico, como el principal o único producto de fermentación. Estas no presentan porfirinas, son catalasa negativas, y no llevan a cabo reacciones de transporte oxidativo de electrones dependientes de citocromo. No llevan a cabo el ciclo de Krebs y obtienen energía por fosforilación a nivel sustrato; no son anaerobias estrictas. En general tienen habilidades biosintéticas limitadas y requerimientos nutricionales complejos, que incluyen: algunos aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas. La producción de ácido por estas bacterias, baja el pH en los alimentos, de tal manera, que pueden impedir la proliferación de otras bacterias, incluyendo bacterias patógenas (Limsowtin *et al*, 2002).

No hay una definición completa, totalmente aceptada, sobre el término bacteria ácido láctica. Este término se usa comúnmente para referirse a bacterias que no forman esporas y están asociados con alimentos fermentados. Por la simple definición

metabólica: produce principalmente ácido láctico; esto incluiría, por ejemplo, algunos patógenos, *Streptococcus* y formadores de esporas, *Sporolactobacillus*. Por otra parte las bifidobacterias son designadas como BAL, aunque su metabolismo tiene algunas diferencias y filogenéticamente están alejadas del resto del grupo. No todas las bacterias usadas en la producción de queso o algunos otros productos lácteos fermentados, son estrictamente LAB y no todas las LAB pueden ser reconocidas como componentes normales de los alimentos fermentados (Limsowtin *et al*, 2002).

La nomenclatura y la clasificación de los varios tipos de bacterias ácido lácticas puede ser muy confusa; esta confusión se da por los cambios en nombres y descripciones de varias especies; estos cambios no son arbitrarios, los nombres y definiciones de las especies, que definen la clasificación taxonómica de las bacterias, son modificadas cuando existe evidencia contundente de que la clasificación actual no define precisamente la verdadera relación filogenética entre diferentes bacterias (Axelson, 1993).

Se han documentado varios beneficios para el ser humano al consumir BAL en alimentos fermentados; entre ellos están: la prevención y el tratamiento de la diarrea y condiciones similares. Su principal papel es preservar la integridad de la flora intestinal. El que éstas se adhieran a las células de la mucosa intestinal y la producción de sustancias antibacteriales, es una de sus funciones más estudiadas. Cabe destacar que son solo algunas las BAL que se han estudiado con este fin. Los probióticos son bacterias viables que son usadas para fermentar algunos alimentos, como productos lácteos. Son varias las propiedades que tiene que tener una bacteria para poder ser catalogada como probiótica. Entre ella la principal es sobrevivir a lo largo del sistema digestivo: la boca, el estómago, y el intestino delgado y grueso; deben ser estables en condiciones gástricas, es decir resistir condiciones ácidas; deben adherirse a las células intestinales humanas, colonizar el tracto intestinal y deben ser antagonistas frente a bacterias patógenas y ser seguras para el consumo humano (Salminen *et al*, 1993).

2.2.1. Sistema proteolítico

Las bacterias ácido lácticas son usadas en la producción de muchos alimentos lácteos como el yogurt y el queso; esto es por que presentan varias funciones metabólicas que son aprovechables: fermentación y degradación de lactosa, reducción del potencial redox, fermentación de citrato y degradación de caseína. Esta última es muy

importante no solo por la producción de fragmentos peptídicos, sino también por que forma parte del desarrollo de la textura y el sabor del producto final.

El estudio del sistema proteolítico de bacterias ácido lácticas, ha sido desarrollado principalmente por su importancia tecnológica durante la fermentación de la leche; se ha observado que este sistema es necesario para un crecimiento en leche rápido y apreciable. En general todas las bacterias usadas para la acidificación de la leche tienen actividad proteolítica.

El sistema proteolítico de estas bacterias puede ser dividido en 3 mecanismos: proteinasas, que degradan las proteínas en péptidos, peptidasas, que degradan los péptidos en aminoácidos, y un sistema de transporte, que introduce en la célula los productos. Podría parecer que la presencia de peptidasas en el sistema representaría un problema para la recuperación de los péptidos, pero se ha comprobado que en general el sistema de proteinasas es extracelular y las peptidasas se encuentran solo dentro de la célula, esto restringe la ruptura de los péptidos a solo aquellos que son introducidos en la célula (Kunji *et al*, 1996).

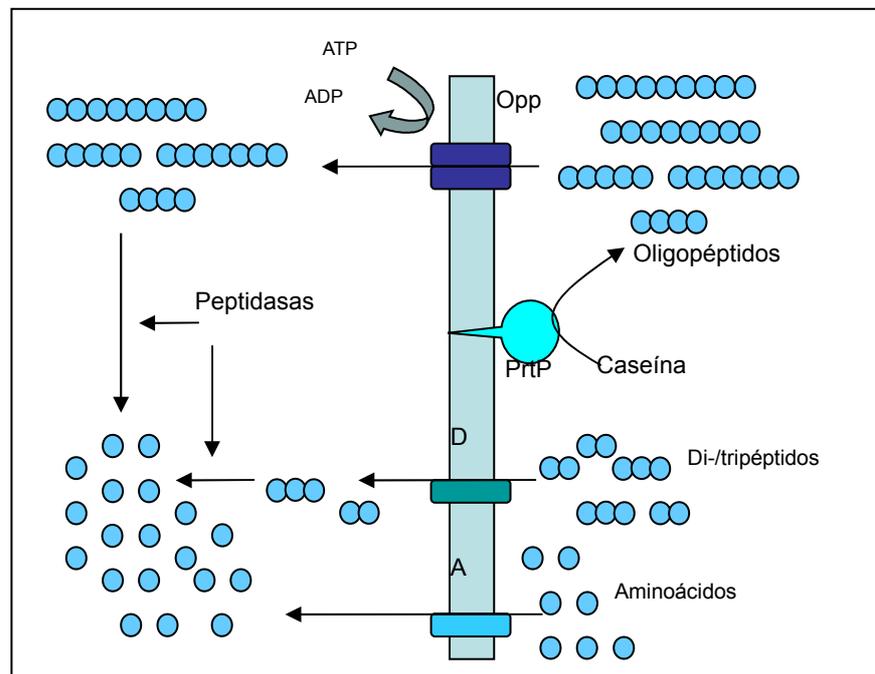


Figura 2.1. Modelo de la vía proteolítica de *Lactococcus lactis*, incluye transporte de dipéptidos y tripéptidos (D) y el sistema de transporte de aminoácidos (A).

La degradación de las caseínas (también degrada las proteínas del suero pero en menor grado) es iniciada por una proteinasa unida a la pared celular (extracelular) (PrtP);

ésta es una serina-proteinasa monomérica, su masa molecular es de unos 180-190 kDa. Según sus perfiles de degradación las proteinasas se han dividido en 2 grupos: las P_I, cuyo principal sustrato es la α -caseína, y las P_{III}, cuyos sustratos son α _{s1}, β , y γ -caseínas.

Los productos de degradación de las caseínas, como resultado de estas proteinasas, se puede clasificar según el tipo de caseína. α -Caseína, algunos estudios indican que durante la degradación de ésta, se forman fragmentos grandes en su mayoría, pero se ha encontrado que en la degradación de esta caseína por la PrtP se forman más de cien oligopéptidos distintos, con entre 4 y 30 residuos, de los cuales la fracción mayor se encuentran entre los 4 y 10 residuos; no se detectan cantidades cuantificables de dipéptidos y tripéptidos. La degradación de β -caseína rinde un gran número de pequeños oligopéptidos, originados en su mayoría por la región 96-106 y la parte del carbono terminal. Cuando la α _{s1}-caseína es degradada se forman aproximadamente 25 oligopéptidos principalmente, aunque también se han encontrado varios fragmentos pequeños (Kunji *et al*, 1996).

La regulación de la actividad de las proteinasas se ha estudiado en varias bacterias ácido lácticas; la síntesis de éstas es inhibida cuando el medio de cultivo contiene hidrolizados de caseína que en su mayoría consiste en péptidos, mientras que en medios que carecen o contiene pocos péptidos la actividad se eleva. La caseína contiene aminoácidos que son necesarios para el crecimiento de la bacteria, pero se calcula que solo un 1% son realmente necesarios, dejando un alto contenido de péptidos en el medio (Kunji, *et al*, 1996).

El sistema proteolítico más estudiado ha sido el de *Lactococcus lactis*, esta bacteria también ha sido reportada como generadora de péptidos bioactivos; se ha observado que muchas otras bacterias lácticas producen péptidos bioactivos: *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* en conjunto con *Lactococcus lactis* (Tabla 2.4). En cuanto a *Lactobacillus casei* no se ha reportado la generación de péptidos bioactivos por medio de éste, sin embargo su similitud con el sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* sugiere la posibilidad de que este pueda liberar péptidos con alguna función a partir de las proteínas de la leche. *Streptococcus thermophilus* ha sido estudiado solamente en conjunto con otras bacterias, no se ha reportado generación de péptidos bioactivos en un cultivo puro de éste.

2.4.2. *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei es un bacilo de tamaño mediano de 1-2.5 μm de largo con un diámetro de aproximadamente 0.5 μm , aunque en general su tamaño varía durante el cultivo; a veces en etapas tardías del cultivo se ha llegado a observar células de más de 4 μm de largo; no presenta flagelo o cilios, ni cápsula, y su pared celular es de entre 20 y 30 nm de ancho (Takahashi, 1999).

Lactobacillus casei es una bacteria anaerobia facultativa, Gram-positiva, mesófila homofermentativa, produce ácido L-láctico, y la estructura de peptidoglicano de su pared celular es del tipo Lisina-Aspartato. Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza; ha sido aislado de productos lácteos y del tracto intestinal de varios animales. Se ha usado ampliamente en la industria alimentaria como un probiótico, debido a su capacidad de sobrevivir al jugo gástrico; ha probado ser más resistente que otras bacterias ácido lácticas a pH bajo (Kandler y Weiss, 1986).

Las bacterias ácido lácticas son generalmente clasificadas en homofermentativas o heterofermentativas, las primeras pueden a su vez dividirse en homofermentativas obligadas y homofermentativas facultativas, estas últimas pueden cambiar a heterofermentativas cuando cambian las condiciones del cultivo. En la tabla 2.6 se observa claramente que *Lactobacillus casei* se encuentra en el grupo de las bacterias homofermentativas facultativas, ya que produce trazas de ácido acético y etanol (Morishita y Deguchi, 1999). Cuando se cultiva en medio con glucosa o lactosa como principal fuente de carbono, *Lactobacillus casei* produce ácido láctico como el producto predominante de la fermentación. Las bacterias homofermentativas producen 2 moles de ácido láctico y 2 moles de ATP por mol de glucosa. La eficiencia de la formación de ATP en el proceso es el doble que para la fermentación heteroláctica (Morishita y Deguchi, 1999).

Tiempo de incubación	Ácido láctico (mg/L)	Ácido acético (mg/L)	Etanol (mg/L)
24 horas	6 600	150	3.6
72 horas	154 010	200	3.0

*Morishita y Deguchi, 1999.

En general todas las bacterias usadas para la acidificación de la leche tienen actividad proteolítica; la mayor actividad es la de *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus*, seguido por *Lactobacillus casei*

(Rajagopal y Sandine, 1990). El modelo del sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* ha sido completamente dilucidado, y estudios genéticos en *Lb. casei* han encontrado una alta similitud en la PrtP, sugiriendo que los sistemas son similares (Morishita y Deguchi, 1999).

Lactobacillus casei es, como ya se mencionó, una bacteria ácido láctica, ésta es usada en la fermentación productos lácteos, como Yakult y Sofúl; varias cepas han demostrado tener actividad de probiótico; entre ellas está *Lactobacillus casei* Shirota que fue aislada en la Universidad de Kioto por Minoru Shirota en los años 1930's, este cultivo ha sido utilizado por la empresa Yakult desde esa época. Un probiótico es uno o la mezcla de varios microorganismos vivos que suplementados en los alimentos afectan beneficiosamente a su hospedador mejorando el balance microbiano del intestino. De esta forma se pueden prevenir enfermedades causadas por un mal balance de la microbiota en el intestino. Algunos estudios han mostrado que los efectos benéficos de estas bacterias, también incluye la producción de ácidos grasos de cadena corta, bacteriocinas, estimulación de el sistema inmunológico, actividad contra patógenos, etc. (Watanabe y Mike, 1999).

2.4.3. *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus thermophilus es una bacteria esférica, no motil, Gram-positivo, de diámetro tiene 0.7-0.9 μm , se presenta en pares o cadenas, algunas de las cuales, pueden ser muy largas. Esta bacteria tiene un crecimiento óptimo entre los 40-45° C de temperatura; un mínimo de 20- 25° C y un máximo de 47-50° C. *Streptococcus thermophilus* no utiliza arginina. Fermenta un número limitado de azúcares que incluyen: lactosa, fructosa, sacarosa y glucosa. Se caracteriza también por ser relativamente sensible a los antibióticos. Es el único entre los *Streptococcus* en no tener un antígeno de grupo específico (Pearce y Flint, 2002).

Streptococcus thermophilus requiere aminoácidos libres para su crecimiento; entre éstos están el ácido glutámico, histidina, metionina, cisteína, valina, leucina, isoleucina, triptófano y tirosina. Esta bacteria crece muy bien en medios que contienen hidrolizados de proteína (Akpemado y Bracquart, 1982; Garault *et al*, 2000).

Streptococcus thermophilus es una bacteria homofermentativa, fermenta la glucosa de la lactosa a L(+) lactato, por medio de la vía de Embden-Meyerhof- Paranas (EMP). Cuando se cultiva en leche, la lactosa es transportada dentro de la célula junto con la

expulsión de galactosa por un sistema antiporte. La lactosa es hidrolizada por la β -galactosidasa, y solamente la glucosa es metabolizada. Un mol de lactosa es fermentada en dos moles de lactato más un mol de galactosa. Esto contrasta con el metabolismo de las bacterias ácido lácticas mesofílicas: la lactosa es transportada como lactosa-6-fosfato y completamente metabolizada a cuatro moles de lactato (Pearce y Flint, 2002).

Todas las bacterias lácticas usadas como cultivos iniciadores, tienen un complejo sistema de peptidasas, que les permite hidrolizar péptidos en aminoácidos. Varias de estas enzimas han sido descritas para *Streptococcus thermophilus*. Esto incluye varias aminopeptidasas, una dipeptidasa, una tripeptidasa y una endopeptidasa (Fernández-Espla y Rul, 1999; Pearce y Flint, 2002). El sistema proteolítico de *Streptococcus thermophilus* es más limitado que en la mayoría de otros cultivos iniciadores (Letort *et al*, 2002), es por esto que se usa en conjunto con bacterias del genero *Lactobacillus*, que son mucho más proteolíticas.

Esta bacteria ácido láctica termofílica es usada en la producción de varios productos lácteos fermentados, normalmente como cultivo iniciador en conjunto con otras bacterias ácido lácticas. La combinación más usada de estas bacterias es la de *Streptococcus thermophilus* con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* usada en la manufactura de yogurt y algunos quesos. *Streptococcus thermophilus* no metaboliza la galactosa, por lo tanto su cultivo normalmente resulta en una acumulación de ésta. La relación entre *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* es muy compleja, una explicación breve de su protocoperación es que *Lactobacillus bulgaricus* libera aminoácidos que estimulan el crecimiento de *Streptococcus thermophilus*, y *Lb. bulgaricus* se ve favorecido por la producción de dióxido de carbono y ácido fórmico de *Streptococcus thermophilus* (Moreira *et al*, 2000; Rajagopal y Sandine, 1990).

4. Justificación

Los péptidos bioactivos pueden ser producidos comercialmente y ser usados como nutraceuticos (sustancia que es un alimento o parte de un alimento que provoca beneficios médicos o a la salud, incluyendo prevención y tratamiento de enfermedades). Un alimento fisiológicamente funcional es aquel que de forma natural contiene sustancias que pueden ser consumidas en la dieta diaria, y que sirve para regular o afecta algún proceso biológico al ser ingerido.

Se han reportado algunos péptidos específicos con actividad biológica tales como: los fosfopéptidos de las caseínas, que son acarreadores de minerales, se han sugerido para suplementar productos como el pan, harina, bebidas, goma de mascar, y para algunas preparaciones farmacéuticas como tabletas, pasta de dientes y material para relleno dental; algunas α -casomorfina han sido recomendadas para administración oral, para incrementar el desempeño de animales, como mayor peso o rendimiento de leche; e hidrolizados de caseína son sugeridos como ingredientes en alimentos funcionales, para prevenir la hipertensión.

Es seguro que en un futuro cercano alimentos funcionales con péptidos bioactivos, penetrarán en el mercado mexicano de los alimentos. Las compañías de la industria de los alimentos, específicamente en el sector de los lácteos, empiezan a interesarse mas en estas sustancias, es decir entienden el beneficio comercial que esto podría acarrearles; tal es el caso de los productos Evolus ® y Calpis ® comercializados en Europa y Japón respectivamente; ambos son leches fermentadas que contienen péptidos antihipertensivos. (Otte *et al*, 2007).

Es por esto que el estudio de los péptidos bioactivos se sugiere en el presente trabajo, en el marco de la manufactura de un producto lácteo fermentado tipo yogurt, tomando especial atención en la actividad antihipertensiva. Estudios y pruebas sobre estas propiedades han sido ampliamente reportadas en varios trabajos desde hace más de diez años.

4. Hipótesis

Durante la fermentación de la leche con bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus casei* y *Streptococcus thermophilus*) se presenta la liberación de péptidos bioactivos cuyo perfil de producción será específico para cada microorganismo y para el cultivo mixto.

5. Objetivos

5.1. General

Conocer el perfil de producción de péptidos antihipertensivos liberados durante la cinética de fermentación en leche con tres cultivos distintos: *Lactobacillus casei*, *Streptococcus thermophilus* y el cultivo mixto de ambas bacterias.

5.2. Particulares

- a. Comparar la capacidad proteolítica en leche de *Lactobacillus casei* y *Streptococcus thermophilus* (aisladas de Sofúl), en cultivos separados y mixto, cuantificando los péptidos liberados.
- b. Comparar la capacidad proteolítica de ambos microorganismos, en diferentes sustratos: leche, suero de leche y caseínas, cuantificando los péptidos liberados.
- c. Determinar la actividad antihipertensiva de los péptidos liberados durante las fermentaciones en los diferentes sustratos.
- d. Caracterizar los péptidos liberados en los diferentes sustratos en función de su peso molecular.

6. Metodología

Con el fin de probar la hipótesis propuesta se realizaron diferentes técnicas, tomadas de diferentes fuentes. Algunas de éstas han sido modificadas con el fin de obtener mejores resultados, y todas fueron probadas antes de ser utilizadas con las muestras.

6.1. Plan de Trabajo

El plan de trabajo que se planteó se observa a continuación; esta metodología se llevó a cabo en tres sustratos: leche, caseínas y suero de leche, para las dos bacterias.

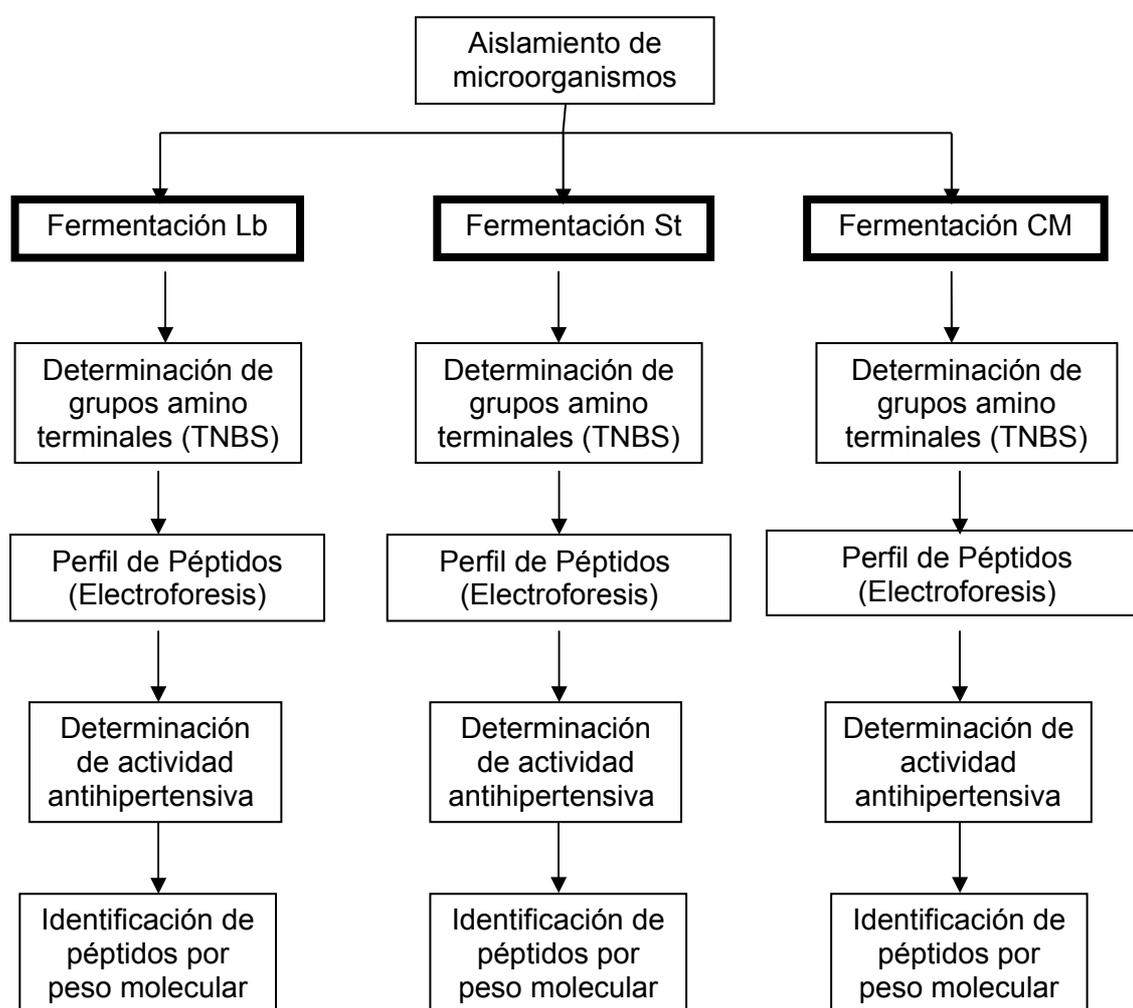


Figura 6.1. Diagrama de la metodología.

Lb: *Lactobacillus casei* Shirota,
St: *Streptococcus thermophilus*,
CM: Cultivo mixto.

6.2. Cepas utilizadas

Se utilizaron dos cepas para llevar a cabo las tres fermentaciones: *Lactobacillus casei* Shirota para la fermentación 1, *Streptococcus thermophilus* para la fermentación 2, y en el caso de la fermentación 3 se llevó a cabo un cultivo mixto utilizando ambas cepas.

Lactobacillus casei fue aislado a partir del producto Yakult producido por Yakult de México. *Streptococcus thermophilus* se obtuvo de Soful producido también por Yakult de México.

Los dos fueron aislados por el método de estría en placas de agar. Se usó el medio de cultivo de Mann Rogosa Sharpe MRS (Disco; Detroit, EUA). El Soful fue diluido (una asa en 10 mL) en agua peptonada al 0.5% antes de ser sembrado. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C. Las cepas se diferenciaron por su morfología; el aislamiento de las bacterias fue comprobado por microscopía y tinción de Gram. Las cepas aisladas se mantuvieron en MRS agar, en refrigeración, hasta el momento de ser utilizadas.

6.3. Fermentación

La fermentación se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 125 mL, con un volumen de trabajo de 50 mL; el procedimiento y los materiales fueron los mismos para cada fermentación. Los matraces fueron inoculados con 5% v/v, y se incubaron por 42 horas a 37 °C. Se tomaron muestras de 3.5 mL para monitorear el pH, 3.5 mL más para determinar los grupos amino libres (TNBS) y el perfil de péptidos (electroforesis), y 0.1 mL para realizar la cuenta de viables. Los tiempos de muestreo fueron: 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 35, 42 horas (se usaron dos matraces desfasados, para poder tomar todas las horas mencionadas). En el caso de la fermentación en suero de leche con *Lactobacillus casei* se prolongó hasta 60 horas para observar si había un aumento en grupos amino terminales al final de la fermentación.

Inóculo: los matraces utilizados para el inóculo fueron Erlenmeyer de 125 mL, con 50 mL de leche descremada (Skim Milk) (Difco, Detroit EUA), al 10 % sólidos totales (S. T.); se sembraron con asa, y se incubaron durante 24 h a 37 °C (hasta alcanzar un pH aproximado de 5).

Preparación de la leche para fermentación: se utilizó leche Skim Milk (Difco; Detroit, EUA) al 10 % S. T.

Preparación del medio de caseínas: se usó 3% caseína (Hammarsten quality, Research Organics; Cleaveland, EUA), 5% lactosa y se adicionó 1.17% de YCB (Yeast Carbon Base) , base para cultivar levaduras sin fuente de nitrógeno (Difco; Detroit, EUA). El pH se ajustó para poder solubilizar las caseínas a un pH de 7.5 con hidróxido de sodio 10 N. Se calentó a 90 °C por 20 minutos para eliminar microorganismos.

Preparación del medio de suero de leche: se utilizó suero de leche 3% (Dermet de México; D. F., México) y YCB al 1.17 % (Difco; Detroit, EUA). Se calentó a 60° C por 30 minutos para eliminar microorganismos.

6.4. Determinación de microorganismos viables

Se monitoreó la fermentación mediante la cuenta en placa; la determinación se hizo por triplicado. Se realizaron diluciones de 1×10^{-4} en los primeros tiempos y 1×10^{-5} en los tiempos finales. Las diluciones se realizaron en tubos de ensaye con 9.9 mL o 9 mL, según el caso, con agua peptonada al 0.5 %. De los tubos de dilución se tomaron 5 μ L y se sembraron en placas de agar MRS (de Mann Rogosa Sharpe, Difco; Detroit, EUA) divididas en 4 (Miles y Misra, 1938). Se dejaron secar por aproximadamente una hora antes de incubar a 37° C. La cuenta se llevó a cabo para *Lactobacillus casei* a las 48 horas de incubación; mientras que para *Streptococcus thermophilus* se contaron las colonias a las 24 horas de incubación.

6.5. Toma de muestras

Las muestras utilizadas en las pruebas posteriores a la fermentación se tomaron a las horas ya antes mencionadas; el procedimiento fue el siguiente: se tomaron 3.5 mL de los matraces de cada fermentación en cada tiempo, y se centrifugó (centrifuga Beckman J2-MI, Rotor Beckman JA-20.1, EUA) a 10,000 rpm durante 30 minutos a 4 °C; enseguida se tomó el sobrenadante y se mantuvo en refrigeración a 4°C, hasta el momento de efectuar la pruebas correspondientes.

6.6. Determinación de grupos amino terminales por el método del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS)

El método del TNBS puede ser usado para cuantificar grupos amino terminales en soluciones diluidas. Éste puede usarse para cuantificar proteínas, péptidos y aminoácidos, se basa en la reacción del ácido trinitrobencensulfónico con grupos amino en un medio ligeramente alcalino; (Freedman y Radda, 1968). El complejo resultante es el trinitrofenil sulfito, el cual es un cromóforo de color naranja y presenta un máximo de absorbancia a 340 nm (Jesse y Choil, 1970). El procedimiento que se siguió fue el siguiente.

- Se agregaron 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.21 M, pH 8.2 en tubos de ensaye forrados con papel aluminio (la reacción es sensible a la luz).
- Se agregó en cada tubo 250 µL de muestra (diluida 5 o 10 veces según la fermentación). En el caso del tubo blanco en lugar de muestra se agregó agua desionizada.
- Se agregaron 2 mL de TNBS (Fluka, Suiza) al 0.10 % en amortiguador de fosfatos 0.21 M pH 8.2 (la preparación de esta solución se llevó a cabo justo antes de realizar la prueba, en la oscuridad), y se agitó cada tubo en vortex.
- Se incubó la mezcla durante una hora a 50 °C en la oscuridad.
- Enseguida se paró la reacción adicionando a cada tubo 4 mL de ácido clorhídrico 0.1 N y se agitaron en vortex.
- Por último se leyó en un espectrofotómetro (Shimadzu, UV-160 A) a 340 nm de longitud de onda contra el blanco; se usaron celdas de cuarzo.

Las pruebas se realizaron por triplicado para su posterior análisis estadístico. En el apéndice 10.1.1 se describe la preparación de las soluciones usadas para esta técnica. La curva patrón para calcular las concentraciones se realizó utilizando glicina; ésta se muestra en el apéndice 10.2.1.

6.7. Análisis de péptidos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE tricina

La SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate - polyacrilamide gel electrophoresis) es la electroforesis de proteínas más ampliamente usada. Se trata de un tipo de electroforesis en la que las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes

desnaturalizantes, β -mercaptoetanol, que rompe los puentes disulfuro y SDS que desnaturaliza y recubre a la proteína. Las proteínas presentan una carga eléctrica neta, por eso tienen la propiedad de desplazarse cuando se someten a un campo eléctrico. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. La tricina en este caso es usada como acarreador de iones, ésta permite la resolución de proteínas pequeñas a bajas concentraciones de acrilamida, en comparación con los sistemas SDS- PAGE glicina.

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida, por acción de un agente entrecruzador ('cross-linking'): la bis-acrilamida; en presencia de un iniciador y un catalizador. Como iniciador se suele utilizar TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y como iniciador el ión persulfato, que se añade en forma de persulfato amónico. Las soluciones de acrilamida se desgasifican pues el oxígeno es un inhibidor de la polimerización; además, durante la polimerización se libera calor que podría provocar la formación de burbujas en el seno del gel.

La porosidad del gel la determina las proporciones relativas de poliacrilamida y bis-acrilamida, siendo menor el poro cuanto más bis-acrilamida en relación con la acrilamida se use. Los geles se denominan en función del %T que es el porcentaje total de acrilamida/bis-acrilamida que contienen, y %C que es el porcentaje de bis-acrilamida; éste determina el grado de entrecruzamiento. Así, la mayoría de las proteínas se separan bien en el rango 5 a 10% de C. Un mayor porcentaje (menor tamaño de poro) es mejor para separar proteínas de bajo peso molecular.

Se utilizó la técnica descrita por Schägger y Von Jagow (1987). Se prepararon geles de poliacrilamida, cada gel con tres distintas capas: el gel separador con 16.5 %T, el espaciador con 10 %T, y el gel concentrador con 4 %T, todos con 3 %C. El pH de los tres geles fue el mismo (8.45). El procedimiento se encuentra descrito más ampliamente a continuación.

Preparación de los geles:

- El **gel separador** fue de 3 %C y de 16.5 %T, el pH fue de 8.45. En la tabla 6.1 se muestra la mezcla realizada; el persulfato de amonio y el TEMED se agregaron después de desgasificar la solución; se preparó un volumen suficiente para preparar un gel que tuviera una altura aproximada de 28 mm (en un gel de 73x82x0.75 mm). Aproximadamente 5 minutos después de poner el gel en los cristales (ya que inició

la polimerización), se agregó agua para evitar el contacto con el aire y la deshidratación del gel. Los geles fueron preparados y corridos en el equipo MiniProtean 3 de BioRad (California, EUA).

Solución	Volumen (mL)
Solución Stock	1.666
Amortiguador pH 8.45	1.666
Glicerol	0.529
Agua desionizada	1.139
Persulfato de amonio 10%	0.0167
TEMED	0.0017

- El **gel espaciador** se preparó con una C de 3% y 10 %T; al igual que con el gel separador se desgasificó la solución antes de agregar el persulfato de amonio y el TEMED (tabla 6.2); la altura de éste fue de 25 mm; el gel se agregó aproximadamente 20 minutos después de verter el gel separador; primero se retiró el agua vertida en el paso anterior y también se agregó agua después de iniciada la polimerización del gel.

Solución	Volumen (mL)
Solución Stock	0.915
Amortiguador pH 8.45	1.500
Agua desionizada	2.085
Persulfato de amonio 10%	0.015
TEMED	0.0015

- El **gel concentrador** se preparó con 3 %C y 4 %T (tabla 6.3), se desgasificó de igual forma, y también se retiró el agua del gel anterior antes de agregarlo; una vez vertido se colocaron los peines y se agregó agua, se dejó polimerizar por 1 hora aproximadamente.

Solución	Volumen (mL)
Solución Stock	0.280
Amortiguador pH 8.45	0.868
Agua desionizada	2.352
Persulfato de amonio 10%	0.028
TEMED	0.0028

Preparación de las muestras:

- Se tomaron 20 μL de muestra y se agregaron 10 μL de amortiguador de muestra, se mezclaron bien y se calentaron durante 30 minutos a 40° C.
- El estándar de leche se preparó igual que las muestras.
- Se tomaron 3 μL del estándar de polipéptidos (BioRad, California, EUA) y se mezclaron con 60 μL de amortiguador de la muestra, se calentó 5 minutos a 95° C.

Corrida del gel:

- Se agregó amortiguador del cátodo al interior de los geles y el amortiguador del ánodo en el exterior (según el equipo utilizado).
- Se inyectaron 25 μL de muestra o estándar según el caso en cada carril; se corrieron a 30 V, usando una fuente de poder BioRad PowerPac 200 (EUA), hasta que las muestras salieran del pozo de inyección (aproximadamente 50 minutos).
- En seguida se subió el voltaje a 90 V, hasta que el frente de corrida llegó al final del gel.

Fijado Teñido y Desteñido:

- Se sacaron los geles de los cristales y se sumergieron en la solución fijadora por 30 minutos.
- Se tiñeron los geles con azul de comassie, se sumergieron durante 1 hora, manteniéndolos en agitación.
- Por último se sumergieron en solución desteñidora por aproximadamente 2 horas cambiando la solución cada hora y manteniéndolos agitados y en la oscuridad.

Los geles se mantuvieron en agua desionizada, en la oscuridad y en refrigeración. Se fotografiaron con una cámara Canon PowerShot SD40.

La preparación de las diferentes soluciones utilizadas en esta técnica se encuentran descritas en el apéndice 10.1.2; todas las curvas patrón utilizadas para calcular los pesos moleculares se encuentran en el apéndice 10.2.2.

6.8. Determinación de actividad antihipertensiva por el método de Cushman y Cheung

Cushman y Cheung en 1970 estudiaron la enzima convertidora de angiotensina (ACE); en su trabajo detallan la forma de detectar mediante espectrofotometría la actividad de ACE. La base de este método está en la forma en la que la enzima actúa; en la figura 6.2 observamos en la primera reacción la conversión de angiotensina I a II; ésta se lleva a cabo hidrolizando el enlace peptídico entre la fenilalanina y la histidina, dando como resultado el dipéptido histidil leucina. En la determinación de la actividad de ACE se usa como sustrato de prueba el hipuril histidil leucina (HHL); la enzima actúa sobre éste de manera similar a la angiotensina liberando también histidil leucina y ácido hipúrico. El ácido hipúrico puede ser extraído de la mezcla de reacción y detectado por espectrofotometría, a una longitud de onda de 230 nm.

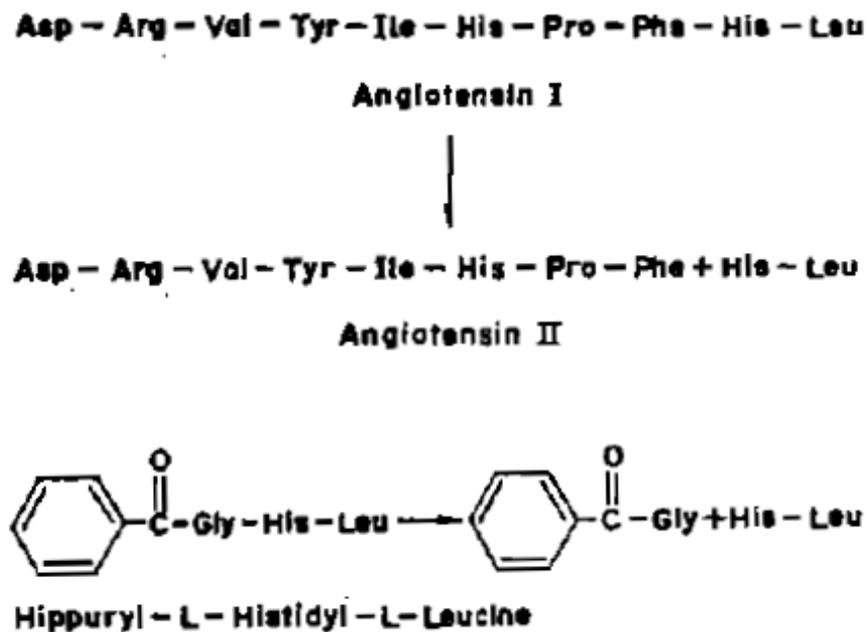


Figura 6.2 Reacciones catalizadas por la enzima convertidora de angiotensina

Los pasos a seguir fueron los siguientes (Fuglsang *et al*, 2002):

- Se tomaron 80 µL de las muestras previamente obtenidas en la fermentación; el pH fue ajustado a 8.3.
- Se agregaron 200 µL de amortiguador de borato 0.1 M pH 8.3 con el sustrato HHL 5 mM (preparado ese mismo día).

- Fueron adicionados 20 μL de enzima (ACE de pulmón de conejo, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis Mo., EUA) 1U/mL, en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M y cloruro de sodio 0.4 M, pH 8.3 (Shalaby *et al*, 2006); se mezcló en vortex.
- Los tubos de reacción se incubaron durante 1 hora a 37 °C.
- Posteriormente, la reacción se detuvo, agregando 250 μL de ácido clorhídrico 1 N, y se agitó en vortex.
- El ácido hipúrico, producto de la reacción, fue extraído con 1.7 mL de acetato de etilo.
- Para lograr una separación completa de las dos fases se centrifugó (centrifuga Sol-Bat J300, México) a 4500 rpm por 5 minutos.
- Se tomaron 400 μL de la fase orgánica.
- Se calentó 30 min a 95 °C, para evaporar todo el acetato de etilo.
- El residuo se resuspendió en 2 mL de agua destilada (se resuspendieron justo antes de leer).
- Por último se leyó la absorbancia a 230 nm de longitud de onda (espectrofotómetro Shimadzu, UV-160 A).

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

El porcentaje de inhibición fue obtenido mediante la ecuación: $(B-A)/(B-C) \times 100$, (Gobbetti *et al*, 2000) donde:

A es la absorbancia de la reacción con enzima, sustrato e inhibidor (muestra);

B es la absorbancia de la reacción con enzima y sustrato (100% de actividad);

C es la absorbancia de la prueba con sustrato, sin enzima ni inhibidor (0% de actividad).

6.9. Análisis estadístico de resultados

El análisis estadístico de los resultados del crecimiento, pH, de la actividad antihipertensiva y de los grupos amino terminales fue realizado con el programa SPSS 13; se llevó a cabo una prueba ANOVA de dos vías con una $P < 0.05$, para determinar si existían diferencias significativas entre los tiempos de cada fermentación y entre fermentaciones; tanto las fermentaciones, como todas las pruebas realizadas se hicieron por triplicado.

7. Resultados y discusión

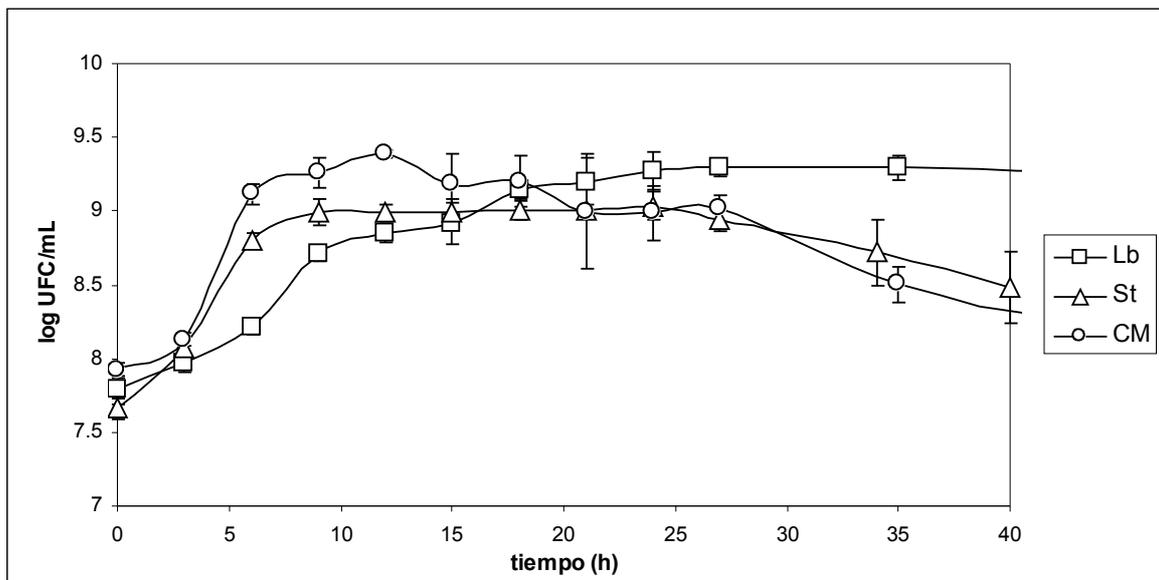
7.1. Fermentaciones

7.1.1. Fermentaciones en leche

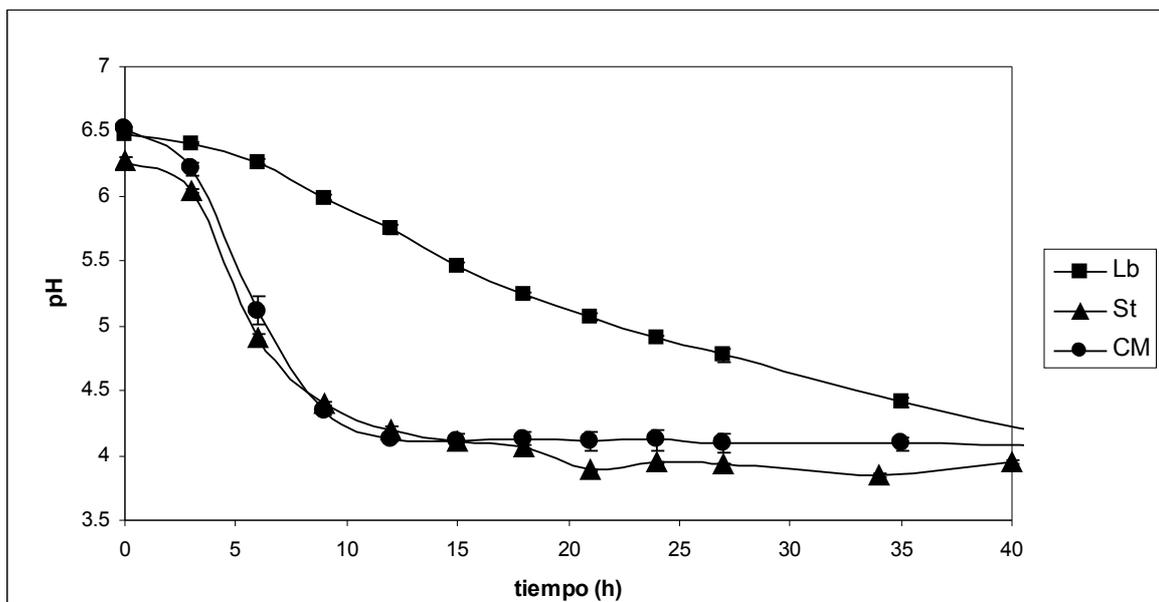
El crecimiento de *Lactobacillus casei*, *Streptococcus thermophilus* por separado y juntos (cultivo mixto), fue determinado por medio del método de cuenta en placa. El crecimiento fue distinto en los tres casos como se puede observar en la gráfica 7.1; los dos microorganismos presentan un comportamiento diferente: *Lactobacillus casei* presentó una fase lag de aproximadamente 6 horas y llegó a la fase estacionaria aproximadamente a las 21 horas a esta hora alcanzo su mayor densidad celular y la mantuvo hasta las 42 horas. *Streptococcus thermophilus*, por el contrario, no presentó una fase lag clara y a las 9 horas alcanzó la fase estacionaria, alcanzando su mayor densidad celular, manteniéndose hasta las 27 horas. El crecimiento para *Streptococcus thermophilus* se da de forma visiblemente más rápida que para *Lactobacillus casei*, sin embargo, este último llega a una densidad celular mayor. En el caso del cultivo mixto se observa un crecimiento rápido y una mayor densidad celular en las primeras 12 horas de fermentación, en comparación con los dos casos antes mencionados; este cultivo alcanzó su punto más alto de crecimiento aproximadamente a las 12 horas y presentó una fase lag de 3 horas. Se debe también mencionar que presenta muerte celular de forma rápida a las 18 horas, de manera que observamos una fase estacionaria más corta. Es claro que existe un efecto sinérgico en el cultivo mixto, como ocurre en otros cultivos (ej. yogurt, Moreira *et al*, 2000). No se llevo a cabo una cuenta diferenciada de los microorganismos, sin embargo se observo el crecimiento de ambos microorganismos, debido a que su morfología es distinta: *Streptococcus thermophilus* crece en colonias pequeñas en comparación con las de *Lactobacillus casei*.

Como se puede observar claramente en la gráfica 7.1, en el cultivo mixto la velocidad de crecimiento supera a la de las dos bacterias por separado; esto es indicio de un comportamiento sinérgico en el cultivo mixto con *Lactobacillus casei* y *Streptococcus thermophilus*. Relaciones como ésta se han descrito ampliamente; la más conocida es la protooperatividad entre *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Rajagopal y Sandine (1990) encontraron que las enzimas proteolíticas de *delbrueckii* subsp. *bulgaricus* degradan las caseínas liberando péptidos de bajo peso molecular; éstos, se identificaron como factores de crecimiento para *Streptococcus thermophilus*, entre otros aspectos más complejos que presenta esta

relación. En nuestro caso, es probable que éste tipo de relación se de, siendo *Streptococcus thermophilus* el que al principio de la fermentación tenga una mayor actividad proteolítica, éste crece más rápido que *Lactobacillus casei*; el crecimiento óptimo de las bacterias ácido lácticas en leche dependen principalmente de su sistema proteolítico (Courtin, *et al*, 2002); en este caso, en el cultivo mixto sería *Streptococcus thermophilus* el que apoyaría a *Lactobacillus casei* en cuanto a la proteólisis.



Gráfica 7.1 Crecimiento de los tres cultivos durante la fermentación en leche, *Lactobacillus casei* (Lb), *Streptococcus thermophilus* (St) y cultivo mixto (CM).



Gráfica 7.2 Perfil de pH de los tres cultivos durante la fermentación en leche, *Lactobacillus casei* (Lb), *Streptococcus thermophilus* (St) y cultivo mixto (CM).

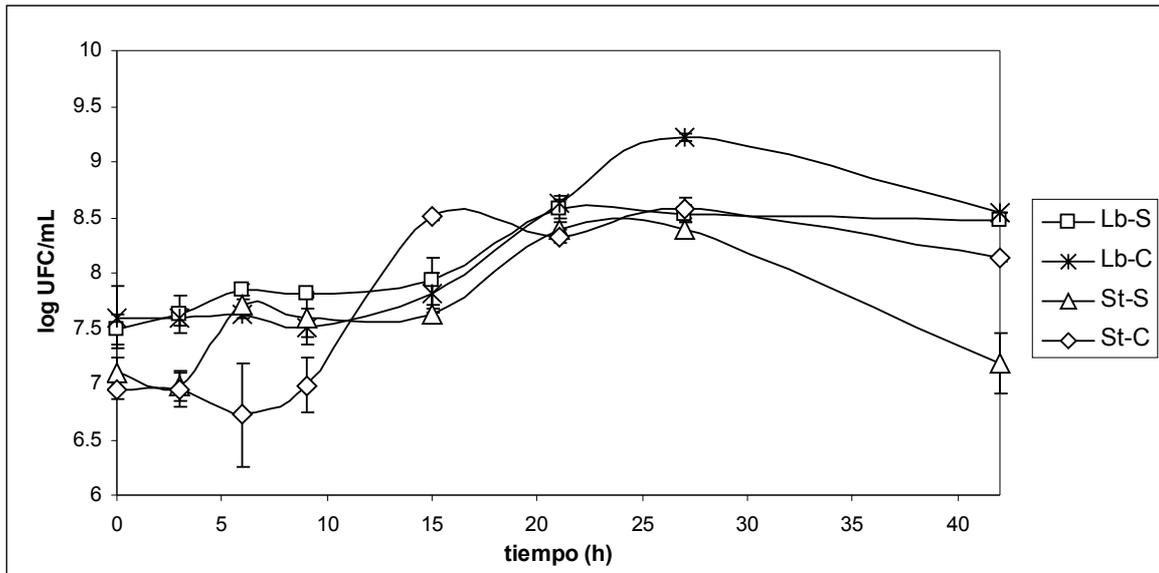
Durante estas tres fermentaciones también se monitoreó el pH del medio (leche). De la misma forma que en el crecimiento, observamos una visible diferencia entre *Lactobacillus casei* y *Streptococcus thermophilus* como podemos apreciar en la gráfica 7.2: de nuevo *Streptococcus thermophilus* acidifica la leche de forma rápida, de modo que a las 12 horas alcanzó valores constantes de pH, llegando a un valor de aproximadamente 4. *Lactobacillus casei* por el contrario mantiene un comportamiento constante, que no parece estabilizarse, llegando hasta un pH de alrededor de 4. Aunque podría decirse que al final ambas bacterias llegan a un mismo punto, el tiempo que tardan en llegar a pH 4 tiene 31 horas de diferencia. Para el caso del cultivo mixto, éste se ve claramente influenciado por la capacidad fermentativa de *Streptococcus thermophilus* y mantienen un comportamiento similar.

7.1.2. Fermentaciones en suero de leche y caseínas

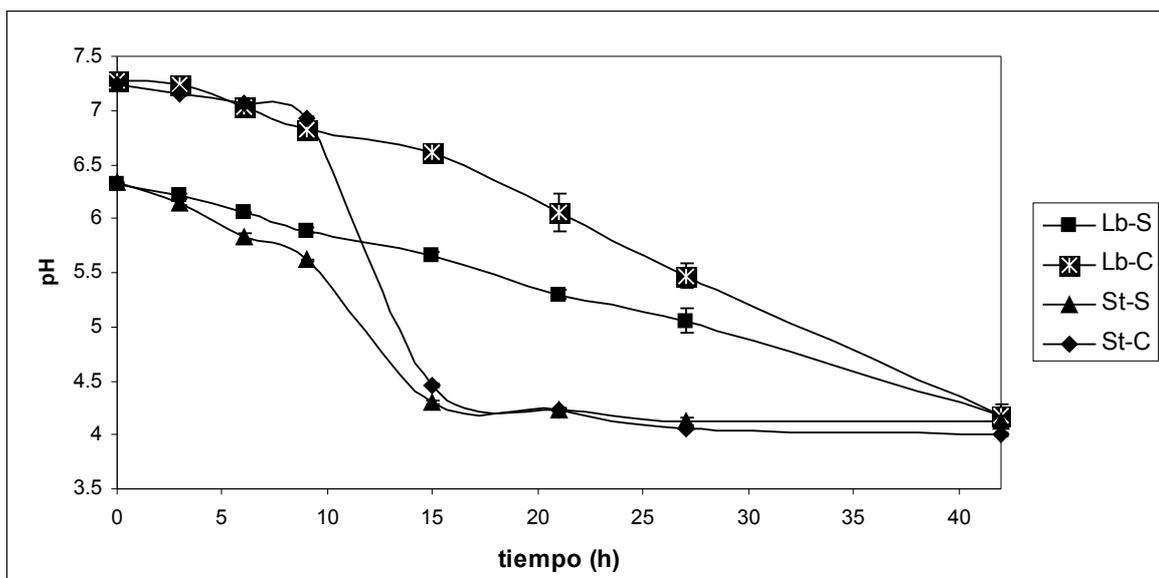
El crecimiento de *Lactobacillus casei* y *Streptococcus thermophilus* en suero de leche y caseínas (gráfica 7.3) fue monitoreado de igual manera que en las fermentaciones con leche. Podemos observar que el crecimiento de *Streptococcus thermophilus* en suero de leche (St-S) concuerda con la caída del pH en el medio (gráfica 7.4); su crecimiento se encuentra en fase exponencial entre las 6 y las 21 horas, es a esta hora en la que se da la mayor densidad celular. El crecimiento para la fermentación con *Streptococcus thermophilus* en caseínas (St-C) muestra, a diferencia del crecimiento en suero de leche, que la fase exponencial es más corta, de las 9 a las 15 horas, llegando a una mayor densidad celular a las 15 horas; esto coincide con la alta velocidad de reducción del pH que ocurre entre las 9 y las 15 horas; prácticamente en 6 horas disminuye el pH de 7 hasta 4.5. *Lactobacillus casei* en suero de leche (Lb-S) a diferencia de *Streptococcus thermophilus*, tiene un fase lag de 15 horas, su crecimiento es mucho más lento, presenta su máxima densidad celular a las 21 horas. En la fermentación en caseínas por *Lactobacillus casei* (Lb-C) el crecimiento presenta una fase lag más corta de 9 horas y una fase exponencial más larga, que llega hasta las 27 horas, alcanza su máxima densidad celular en este momento.

El pH de las fermentaciones en suero de leche y caseínas fue registrado; estos resultados se observan en la gráfica 7.4. En el caso de la fermentación con *Streptococcus thermophilus* en suero de leche (St-S), el pH disminuye rápidamente a un pH de 4 en 15 horas. De manera similar *Streptococcus thermophilus* en caseínas (St-C), llega al mismo pH en el mismo tiempo a pesar de tener un pH inicial más alto (para lograr

solubilizar las caseínas, el pH de este medio se ajusto a 7.5). El pH del medio durante la fermentación por *Lactobacillus casei* en suero de leche (Lb-S) baja casi constantemente hasta alcanzar alrededor de 4. En la fermentación en caseínas por *Lactobacillus casei* (Lb-C) el pH decrece a una velocidad constante, pero de forma muy lenta en comparación con las demás fermentaciones; es posible que al inicio tardara más por el valor alto del pH inicial; sin embargo, al final llega alrededor de 4, al igual que en la fermentación en suero de leche.



Gráfica 7.3 Crecimiento de *Lactobacillus casei* (Lb) y *Streptococcus thermophilus* (St) en suero de leche (S) y caseínas (C).



Gráfica 7.4 Perfil de pH de *Lactobacillus casei* (Lb) y *Streptococcus thermophilus* (St) en suero de leche (S) y caseínas (C).

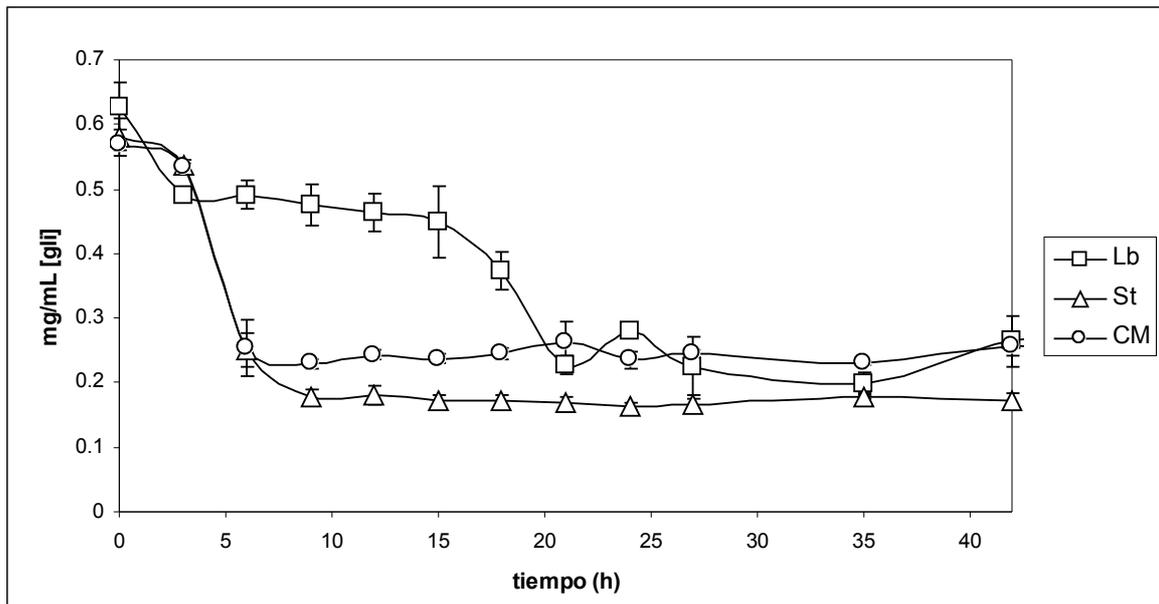
El crecimiento *Lactobacillus casei* en los dos medios no presenta diferencias significativa al final de la fermentación, mientras que *Streptococcus thermophilus* si, en el suero de leche tiene menor densidad celular al final de la fermentación. Es evidente que *Streptococcus thermophilus* fermenta más rápido en todos los medios; *Lactobacillus casei* es más lento; sin embargo, en todos los casos ambas bacterias llegan a las mismas condiciones finales de pH;. Esto puede implicar una actividad proteolítica mayor inicial en *Streptococcus thermophilus*. Shahbal *et al* (1991) encontraron que una alta actividad de proteinasas asociadas a la pared de algunas cepas de *Streptococcus thermophilus* se correlaciona con una alta velocidad en la disminución del pH en leche. En cuanto a *Lactobacillus casei* es posible que use inicialmente los péptidos encontrados originalmente en el medio; éstos se encuentran en una concentración pequeña y permiten solo un crecimiento pobre. Para que una bacteria láctica pueda crecer al máximo y reducir el pH del medio por debajo de 5, necesita poder disponer de las proteínas de la leche (Shahbal *et al*, 1991); es obvio que *Lactobacillus casei* tiene esta capacidad puesto que logra disminuir el pH por debajo de 4.5; tarda en alcanzar las mismas condiciones que *Streptococcus thermophilus*, porque posiblemente la actividad proteolítica de *Lactobacillus casei* es mucho menor.

7.2. Determinación del grado de proteólisis mediante los grupos amino terminales

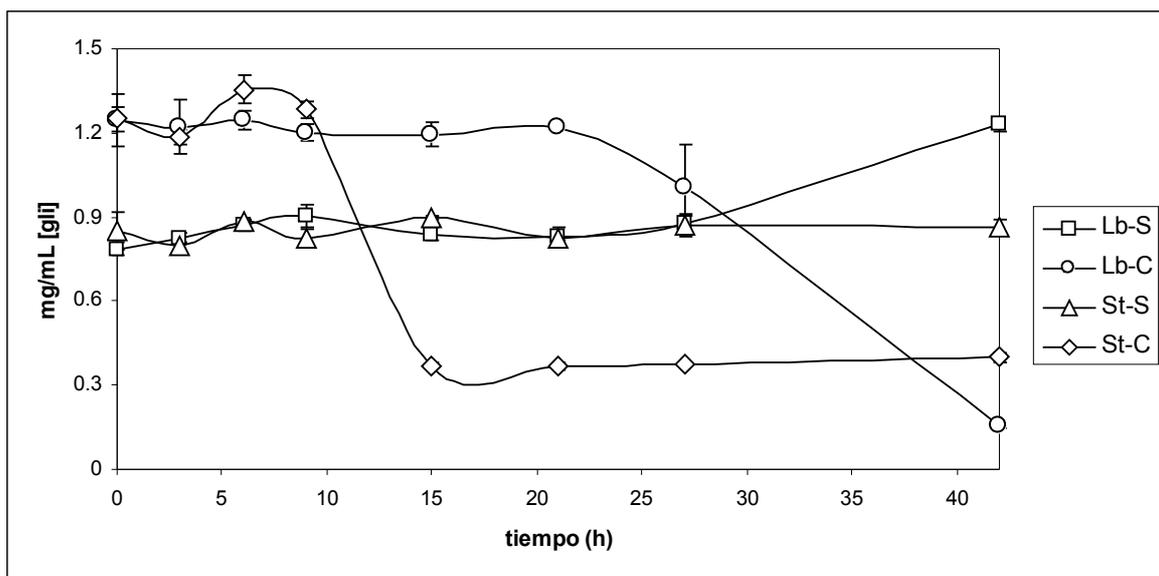
Se obtuvieron muestras durante las fermentaciones que posteriormente fueron analizadas para determinar el grado de proteólisis, midiendo la concentración de grupos aminos terminales liberados, por el método de TNBS (esta técnica es capaz de detectar µg, sin embargo no es sensible a variaciones de grupos amino terminales específicos). Al igual que en los dos casos anteriores, se determinó el comportamiento en los tres cultivos.

En la gráfica 7.5 podemos observar que *Lactobacillus casei* presenta un comportamiento diferente al de *Streptococcus thermophilus*; la disminución de los grupos amino terminales en el primero se da paulatinamente, hasta aproximadamente las 21 horas donde se mantiene una concentración constante (0.21 mg/mL); cabe destacar que es a las 21 horas también cuando entra a la fase estacionaria de crecimiento. En el caso de *Streptococcus thermophilus* observamos una rápida disminución de los grupos amino terminales, de modo que a las 9 horas alcanzamos una concentración constante (0.17 mg/mL); al igual que *Lactobacillus casei* podemos observar que el comportamiento de los

grupos amino terminales está relacionado con el crecimiento. En el cultivo mixto observamos un comportamiento similar al de *Streptococcus thermophilus*, (como ocurre en el perfil de pH): a las 9 horas de fermentación tenemos un comportamiento constante aunque observamos una menor disminución, como en el caso de *Lactobacillus casei*; igual que en los casos anteriores, este comportamiento también concuerda con el crecimiento. En los tres casos, los grupos amino terminales presentan una disminución que coincide con el crecimiento de cada cultivo, esto puede deberse al consumo y la precipitación de las caseínas debido al pH del medio; lo que puede enmascarar la producción de péptidos.



Gráfica 7.5 Grupos amino terminales de los tres cultivos durante la fermentación en leche.



Gráfica 7.6 Grupos amino terminales de *Lactobacillus casei* (Lb) y *Streptococcus thermophilus* (St) en suero de leche (S) y caseínas (C).

En la gráfica 7.6 observamos los grupos amino terminales de las muestras tomadas durante las fermentaciones en suero de leche y caseínas. En el caso del suero de leche con *Streptococcus thermophilus* (St-S) algo a destacar es que el contenido de grupos amino terminales permanece constante; esto puede sugerir que consume las proteínas y produce péptidos de manera que no se observe un cambio aparente. Para *Streptococcus thermophilus* en caseínas (St-C) observamos la disminución de los grupos amino terminales que inicia a las 9 horas, junto con el crecimiento; es muy claro que existen diferencias en como se consumen las proteínas del suero y las caseínas. Los grupos amino terminales no decrecen en la fermentación con *Lactobacillus casei* en suero de leche (Lb-S); en cambio, en este caso vemos claramente un aumento en ellos que inicia alrededor de las 27 horas. Esto puede implicar una producción de péptidos que posiblemente presenten actividad biológica. En cuanto a la fermentación con *Lactobacillus casei* en caseínas (Lb-C), observamos que no hay variabilidad en su concentración hasta las 21 horas de fermentación cuando inicia el descenso de los grupos amino terminales. Cabe destacar que en el caso de las fermentaciones en caseínas, la alta disminución de grupos amino terminales se puede deber en gran medida a la precipitación de las caseínas debido al pH bajo.

Una de las diferencias más claras entre el cultivo de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei* durante su crecimiento en suero de leche es la producción de péptidos que se observa a partir de las 21 horas de fermentación con *Lactobacillus casei*; podemos asegurar que existe producción de péptidos. En el caso de *Streptococcus thermophilus* no se observa ni consumo ni producción de péptidos o proteínas; es posible que el consumo y la producción estén acoplados ya que la concentración de grupos amino libres permanece constante. En las fermentaciones en caseína, no podemos asegurar que no haya liberación de péptidos, ya que es posible que la disminución de grupos amino terminales en el caso del medio de caseína, sea debido a la precipitación de las caseínas por el pH bajo, esto, y el consumo de los productos de hidrólisis, pueden causar este efecto aparente.

7.3. Determinación de pesos moleculares por SDS- PAGE

También se llevaron a cabo pruebas de electroforesis en gel de poliacrilamida, con el fin de observar la hidrólisis de proteínas y la presencia de péptidos; junto con las muestras se inyectó un estándar de leche y uno de polipéptidos (cuyos pesos se encuentren escritos en las figuras).

La figura 7.1 muestra la fotografía del gel con las muestras obtenidas durante la fermentación de *Lactobacillus casei*; podemos observar claramente la disminución de las proteínas de leche (caseínas, α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina) a través del tiempo; en el caso de las caseínas esto puede deberse no solo a la proteólisis también a la precipitación; específicamente entre las 9 y las 15 horas es más clara la disminución en la intensidad de las banda; y este intervalo concuerda con el tiempo en el que el crecimiento llega a un punto máximo y se vuelve estacionario (gráfica 7.1). Es importante mencionar la presencia de bandas tenues entre 6.5 y 3.4 kDa, éstas seguramente son debidas a péptidos. Éstos a lo largo del tiempo se van haciendo más notorios; en la tabla 7.1 podemos ver los pesos calculados de los péptidos encontrados que van de 3.7 a 8.9 kDa.

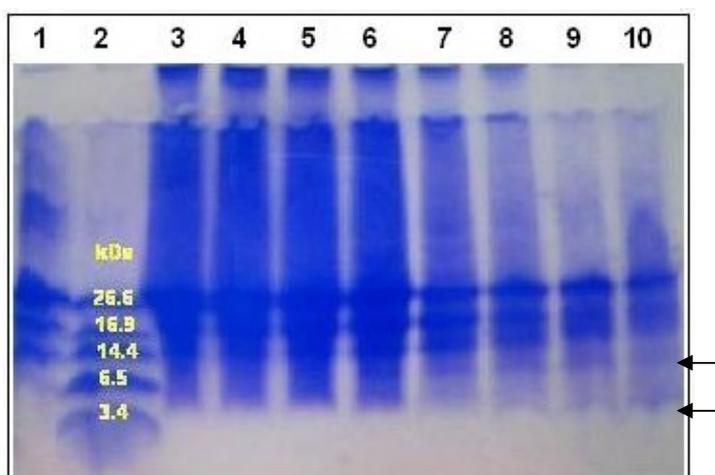


Figura 7.1 Electroforesis en gel de poliácridamida de la fermentación en leche con *Lactobacillus casei*. Carril 1: Leche, 2: estándar de polipéptidos, 3: 0h, 4: 3h, 5: 6h, 6: 9h, 7: 15h, 8: 21h, 9: 27h, 10: 42h.

Tabla 7.1 Pesos moleculares (kDa) de los péptidos encontrados en la fermentación en leche con <i>Lactobacillus casei</i> (Bandas por debajo de 14 kDa)							
0 h	3 h	6 h	9 h	15 h	21 h	27 h	42 h
5.5	5.5	5.5	4.9	8.1	8.1	8.9	8.9
				4.1	3.7	3.7	3.7

En la fermentación con *Streptococcus thermophilus* (figura 7.2), podemos observar un cambio de manera más marcado en comparación con los resultados de *Lactobacillus casei*, este puede ser por la proteólisis o por la precipitación por el pH; en este caso para las 6 horas es cuando se da el cambio más claro, que concuerda con el crecimiento. Se observan bandas en parte inferior de la imagen más tenues, que indican la presencia de péptidos con pesos moleculares entre 3.5 y 8 kDa (tabla 7.2).

El cultivo mixto (figura 7.3), como lo hemos observado en el caso del pH y de los grupos amino libres, presenta un comportamiento similar al presentado por *Streptococcus*

thermophilus. Tenemos una clara disminución en las bandas superiores debido a la precipitación de las caseínas y la proteólisis, que se da de forma más drástica entre el lapso de las 3 a las 9 horas, lo que concuerda con el comportamiento presentado anteriormente (gráfica 7.5); también en esta imagen podemos observar bandas tenues al final de los carriles, que como ya se ha mencionado, son correspondientes a péptidos entre 2.4 y 6.2 kDa (tabla 7.3).

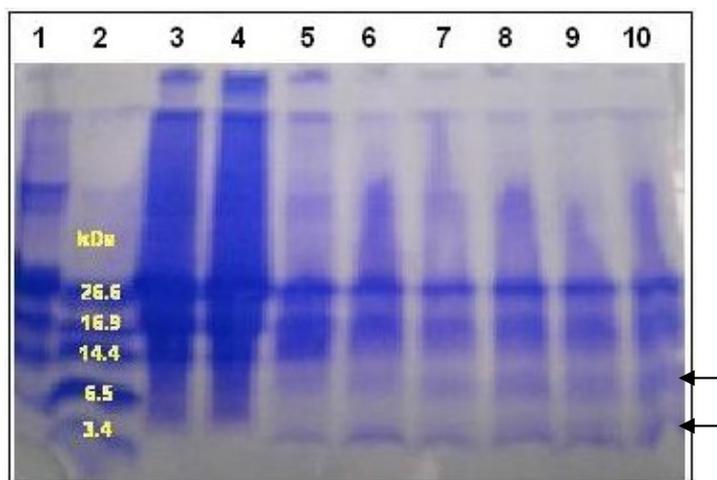


Figura 7.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida de la fermentación en leche con *Streptococcus thermophilus*. Carril 1: Leche, 2: estándar de polipéptidos, 3: 0h, 4: 3h, 5: 6h, 6: 9h, 7: 15h, 8: 21h, 9: 27h, 10: 42h.

0 h	3 h	6 h	9 h	15 h	21 h	27 h	42 h
7.4	8.0	8.0	8.0	8.0	7.4	7.4	7.4
4.9	5.3	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5

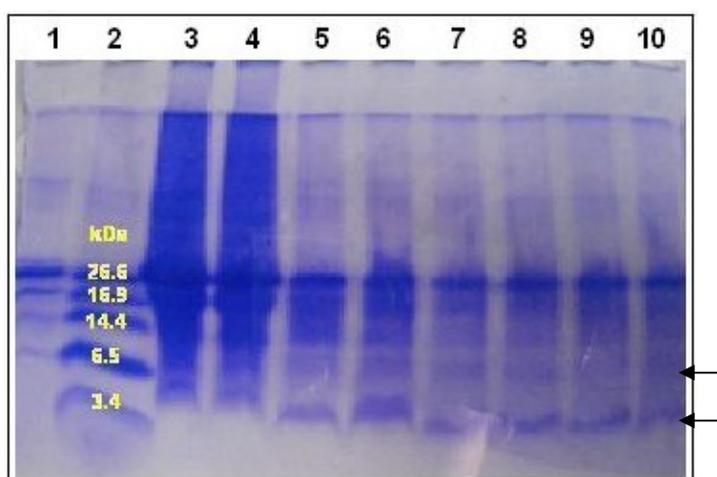


Figura 7.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida de la fermentación en leche con cultivo mixto. Carril 1: Leche, 2: estándar de polipéptidos, 3: 0h, 4: 3h, 5: 6h, 6: 9h, 7: 15h, 8: 21h, 9: 27h, 10: 42h.

Tabla 7.3 Pesos moleculares (kDa) de los péptidos encontrados en la fermentación en leche con cultivo mixto (Bandas por debajo de 14 kDa)							
0 h	3 h	6 h	9 h	15 h	21 h	27 h	42 h
4.1	3.5	6.2	5.7	5.7	5.7	5.7	6.2
		2.7	2.9	2.5	2.5	2.5	2.5

En el caso de la fermentación en caseínas con *Lactobacillus casei* (figura 7.4), la proteólisis no es tan clara como en los geles en leche o en el caso de los grupos amino terminales para la misma fermentación (gráfica 7.4); esto se debe al ajuste del pH realizado después de la toma de muestra para resuspender las caseínas). En este caso observamos un mayor número de bandas por debajo de los 14 kDa (tabla 7.4), los cuales van variando según el tiempo de fermentación; los pesos moleculares van en un rango similar a las fermentaciones en leche: de 8.4 a 3.0 kDa.

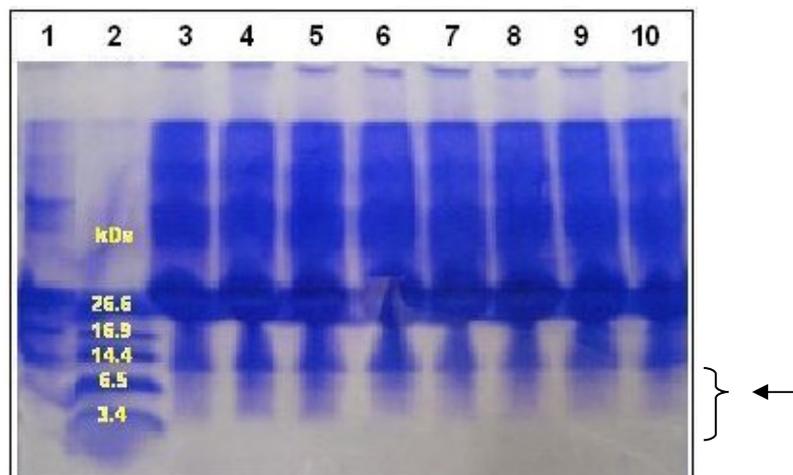


Figura 7.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida de la fermentación en caseínas con *Lactobacillus casei*. Carril 1: Leche, 2: estándar de polipéptidos, 3: 0h, 4: 3h, 5: 6h, 6: 9h, 7: 15h, 8: 21h, 9: 27h, 10: 42h.

Tabla 7.4 Pesos moleculares (kDa) de los péptidos encontrados en la fermentación en caseínas con <i>Lactobacillus casei</i> (Bandas por debajo de 14 kDa)							
0 h	3 h	6 h	9 h	15 h	21 h	27 h	42 h
7.9	8.4	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
6.7	6.7	6.7	5.9	5.9	6.7	6.7	5.9
5.3	5.9	5.9	5.3	5.3	5.9	4.7	5.3
4.7	4.7	4.7	3.8	4.2	4.7		
4.2	3.8	3.8	3.4	3.8	3.8		
3.4		3.4		3.0	3.4		

En el gel con las muestras de la fermentación en suero de leche con *Lactobacillus casei* (figura 7.5), no se observan bandas bien definidas por debajo de los 14.4 kDa; esto puede ser debido a que los péptidos formados son pequeños, una gran cantidad de péptidos de bajo peso molecular son descritos como altamente antihipertensivos (Hong

et al,2008; Yamamoto et al, 1999; Nakamura et al, 1995), sin embargo, por medio de esta técnica no son fácilmente detectables;

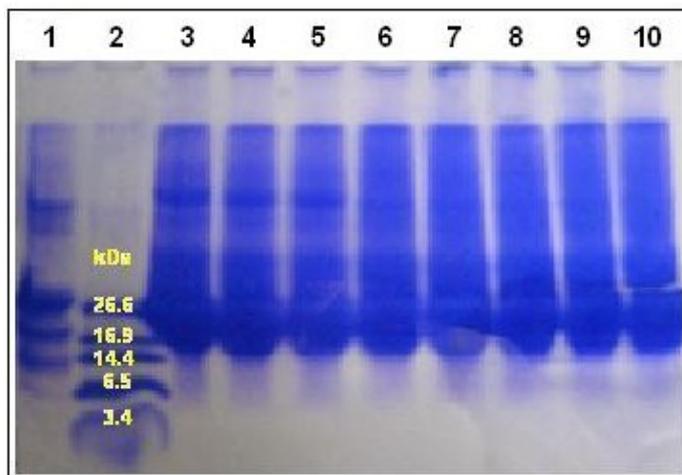


Figura 7.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida de la fermentación en suero de leche con *Lactobacillus casei*. Carril 1: Leche, 2: estándar de polipéptidos, 3: 0h, 4: 12h, 5: 24h, 6: 36h, 7: 42h, 8: 48h, 9: 54h, 10: 60h.

En la figura 7.6 se observa el gel de poliacrilamida de la fermentación con *Streptococcus thermophilus* en caseínas; en él se observa una disminución de proteínas (caseína, α -lactoalbúmina y β -globulina) a partir de las 15 horas, de manera similar a las fermentaciones en leche; como en el caso de los grupos amino terminales esto puede explicarse por la proteólisis y la precipitación de las caseínas (en este caso no se ajustó el pH después de la toma de muestras).

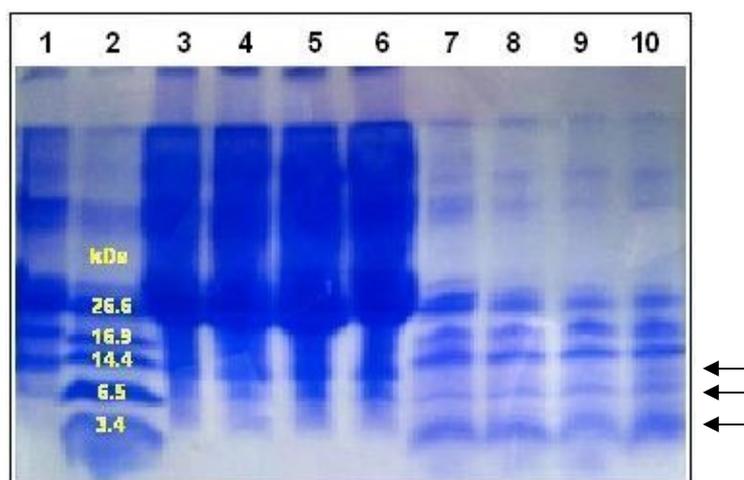


Figura 7.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida de la fermentación en caseínas con *Streptococcus thermophilus*. Carril 1: Leche, 2: estándar de polipéptidos, 3: 0h, 4: 3h, 5: 6h, 6: 9h, 7: 15h, 8: 21h, 9: 27h, 10: 42h.

En la tabla 7.5 se presentan los pesos moleculares de los péptidos observados en el gel; al igual que en la fermentación con *Lactobacillus casei* en caseínas (figura 7.4) se observan varias bandas en los distintos tiempos. En este caso los pesos moleculares van

de 13.2 a 3.9 kDa; cabe destacar que el perfil de péptidos encontrados en las fermentaciones en caseínas de ambas bacterias, presentan una variedad de péptidos distinta.

Tabla 7.5 Pesos moleculares (kDa) de los péptidos encontrados en la fermentación en caseína con <i>Streptococcus thermophilus</i> (Bandas por debajo de 14 kDa)							
0 h	3 h	6 h	9 h	15 h	21 h	27 h	42 h
9.9	9.9	8.2	13.2	9.1	9.1	9.1	9.1
8.2	8.2	7.5	12.0	7.5	7.5	7.5	7.5
6.8	7.5	5.7	6.2	5.2	5.2	4.7	4.7
5.7	5.7	4.7	5.7	4.3	4.3	4.3	3.9
4.3	4.3						

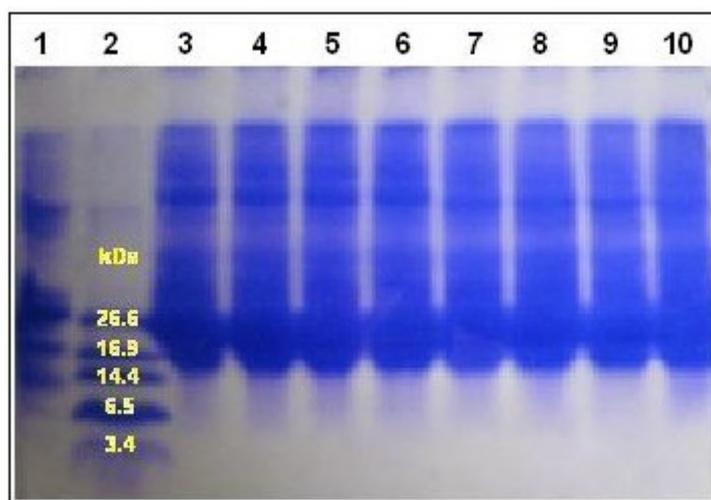


Figura 7.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida de la fermentación en suero de leche con *Streptococcus thermophilus*. Carril 1: Leche, 2: estándar de polipéptidos, 3: 0h, 4: 3h, 5: 6h, 6: 9h, 7: 15h, 8: 21h, 9: 27h, 10: 42h.

Los resultados de la electroforesis de la fermentación en suero de leche por *Streptococcus thermophilus* se pueden observar en la figura 7.7. No se obtuvieron bandas definidas por debajo de los 14.4 kDa, como en la fermentación en suero de leche con *Lactobacillus casei* (figura 7.5); esto puede deberse a que los péptidos producidos son de un peso molecular muy bajo.

Es claro que el perfil de péptidos presentes en cada fermentación es diferente en cuanto a los pesos moleculares que se encontraron y los tiempos. También puede darse el caso que se formen péptidos más pequeños o en concentraciones menores, que no son detectables con esta técnica, como ya se mencionó en los casos de las fermentaciones en suero de leche. Las figuras nos permiten asegurar que en cada fermentación en leche hay péptidos presentes; la tabla 7.6 nos muestra similitudes de los pesos moleculares encontrados experimentalmente, con los pesos moleculares de péptidos antihipertensivos descritos por Hong *et al* (2008) y Yamamoto *et al* (1994); esto

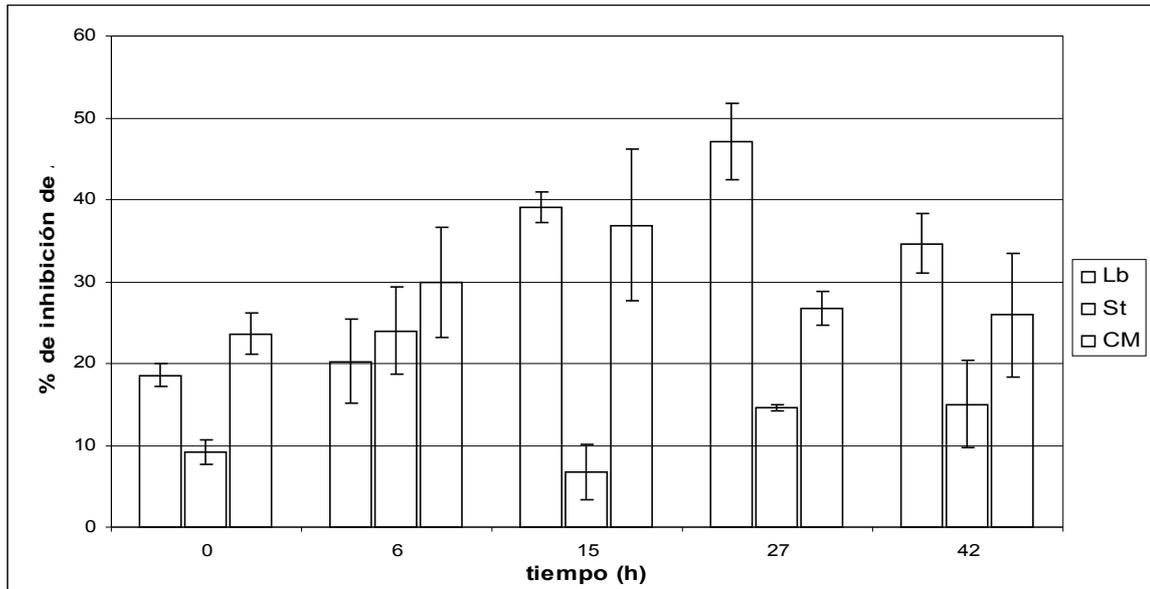
nos permite pensar que varios de estos péptidos tienen actividad antihipertensiva. En las fermentaciones en leche podemos notar un aumento de éstos a través del tiempo. El que se encuentren en concentraciones pequeñas no implica necesariamente que la actividad biológica que puedan presentar sea baja; Schlimme *et al* (1990) han reportado que cantidades muy pequeñas de péptidos liberados son suficientes para presentar actividad fisiológica detectable.

Tabla 7.6 Comparación por pesos moleculares de los péptidos encontrados durante las fermentaciones en leche, suero de leche y caseínas, con péptidos con actividad antihipertensiva reportados		
Fermentación	Péptidos encontrados por SDS-PAGE (kDa)	Péptidos antihipertensivos reportados (kDa)
Cultivo mixto (leche)	2.5	2.47*
<i>Lactobacillus casei</i> (caseínas)	3.4	3.35*
Cultivo mixto (leche)	3.5	3.35*
<i>Streptococcus thermophilus</i> (leche)	3.5	3.51**
<i>Lactobacillus casei</i> (leche)	3.7	3.624*
<i>Lactobacillus casei</i> (caseínas)	3.8	3.624*
<i>Streptococcus thermophilus</i> (caseínas)	3.9	3.9**
<i>Lactobacillus casei</i> (leche)	4.1	3.9**

(*Hong *et al*, 2008; **Yamamoto *et al*, 1994)

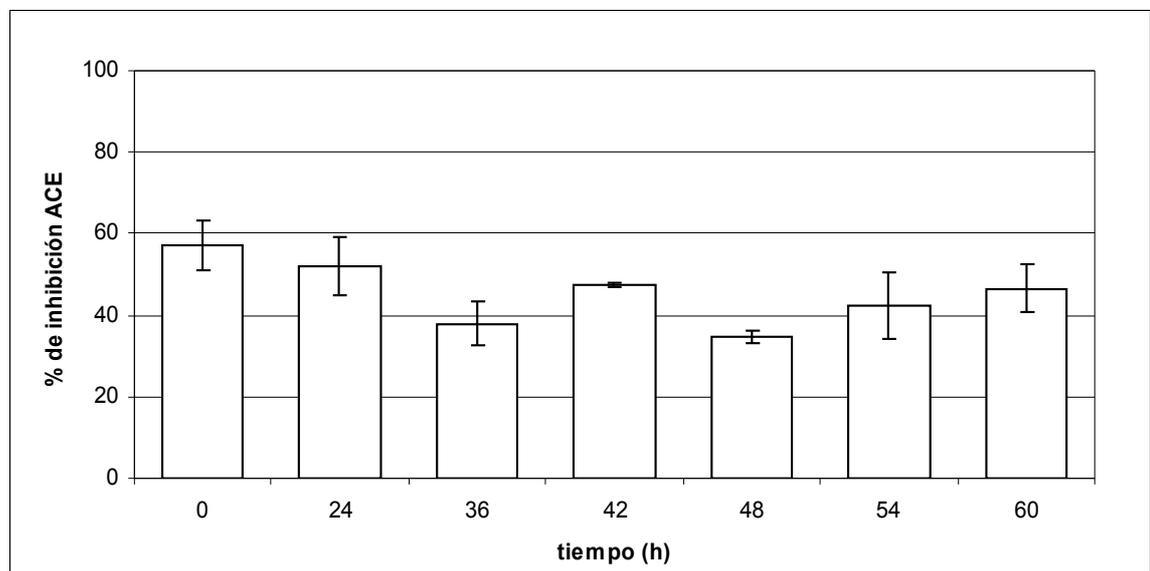
7.4. Determinación de la actividad antihipertensiva

En la gráfica 7.7 se observan los porcentajes de inhibición de ACE de las muestras tomadas en las fermentaciones con leche. Existe un claro aumento de actividad antihipertensiva en el cultivo con *Lactobacillus casei* en la hora 27 con un 47 % de inhibición, significativamente diferente a los demás tiempos de esta fermentación; en el caso de la fermentación con *Streptococcus thermophilus* su mayor inhibición se da en la hora 6 con un 24 %, aunque este valor no es significativa mente diferente a los del tiempo 0 y 42; para el cultivo mixto su máximo se presenta en la hora 15 con 37% de inhibición, éste solo es significativamente diferente a el tiempo 0. La diferencia en los porcentajes de inhibición entre los cultivos de bacterias solas y en cultivo mixto concuerda con los resultados de electroforesis, en los que se encontraron péptidos de distintos pesos moleculares que presentan diferente actividad antihipertensiva.



Gráfica 7.7 Actividad antihipertensiva por inhibición de ACE de las muestras de las fermentaciones en leche con (Lb) *Lactobacillus casei*, (St) *Streptococcus thermophilus*, (CM) Cultivo mixto

Por los resultados de la gráfica 7.7 se pensó que era posible que el aumento en la actividad antihipertensiva que presenta *Lactobacillus casei* en leche, alrededor de las 27 horas, estuviera relacionada con el aumento de grupos amino terminales, que presenta esta bacteria en suero de leche a partir de las 25 horas (gráfica 7.6).



Gráfica 7.8 Actividad antihipertensiva por inhibición de ACE de las muestras de las fermentación en suero de leche con *Lactobacillus casei*.

Para comprobar si esta producción de péptidos era la causante de la alta actividad antihipertensiva mostrada por *Lactobacillus casei* en leche, se realizó una prueba de actividad antihipertensiva a las muestras tomadas durante la fermentación con dicha

bacteria en suero de leche, el resultado de esta prueba se muestra en la gráfica 7.8; no hay diferencias significativas a lo largo de la fermentación, esto indica que el aumento de actividad antihipertensiva en la leche fermentada por *Lactobacillus casei*, no es provocado por los péptidos producidos en suero de leche por esta bacteria ácido láctica, aunque no se descarta la posibilidad de que dichos péptidos puedan presentar otras actividades biológicas funcionales. Esto implica también que la actividad antihipertensiva presente en las muestras de la fermentación en leche de *Lactobacillus casei* proviene muy posiblemente de péptidos derivados de las caseínas: los péptidos bioactivos reportados son en su mayoría, fragmentos de caseínas (Fitzgerald y Murray, 2006).

8. Conclusiones

- *Streptococcus thermophilus* ($\mu=0.437$ en leche, $\mu=0.580$ en caseína) muestra una diferencia significativa ($p<0.05$) en la velocidad de crecimiento en leche y caseínas con respecto a *Lactobacillus casei* ($\mu=0.236$ en leche, $\mu=0.215$ en caseína); se puede sugerir que *Streptococcus thermophilus* tiene una mayor actividad proteolítica en comparación con *Lactobacillus casei*.
- Durante la fase exponencial de crecimiento de las fermentaciones de leche y caseína se da, simultáneamente, la disminución de grupos amino terminales, indicando que el cambio en éstos últimos está relacionado con el crecimiento de las bacterias.
- En la fermentación en suero de leche con *Lactobacillus casei* se observó un aumento en la concentración de grupos amino terminales a partir de las 27 horas de fermentación, esto es debido a la generación de péptidos.
- El perfil de péptidos (electroforesis) producido por cada microorganismo y el cultivo mixto durante la fermentación en leche, suero de leche y caseína, muestra diferencias en términos de su peso molecular (en un rango de 2.5 a 9.1 kDa). Se encontraron péptidos de pesos moleculares similares a péptidos reportados como antihipertensivos.
- Las fermentaciones en leche presentaron en todos los casos y en diferentes tiempos actividad antihipertensiva, los porcentajes de inhibición de ACE van de 6.7% a 47.1%; lo cual sugiere que la producción de péptidos bioactivos es dependiente de la actividad proteolítica específica de cada cultivo.
- Durante la fermentación en suero de leche con *Lactobacillus casei* no se observó cambio en la actividad antihipertensiva con respecto a la actividad inicial, lo que implica que la inhibición de ACE observada en la fermentación de leche no es debida a péptidos generados a partir de las proteínas del suero de leche.

9. Bibliografía

- **Akpmado, K. M.**, P. A. Bracquart. 1983. Uptake of branched-chain aminoacids by *Streptococcus thermophilus*. Applied and Environmental Microbiology. 45:136-140.
- **Axelson, L.T.**, 1993. Lactic acid bacteria: classification and physiology. En Salminen, S., A. von Wright (ed.), Lactic Acid Bacteria. New York, E.U.A. Marcel Dekker. pp 1-63.
- **Clare, D. A.**, H. E. Swaisgood. 2000. Bioactive milk peptides: A prospectus. Journal of Dairy Science. 83:1187-1195.
- **Courtin, P.**, V. Monnet, F. Rul. 2002. Cell-wall proteinasas PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus/Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. Microbiology. 148:3413-3421.
- **Creamer, L. K.** 2002. Casein nomenclature. En Roginsky, H., J. W. Fuquay, P. F. Fox (ed.), Encyclopedia of Dairy Sciences. Londres, Reino Unido. Academic Press. Vol 3, pp1895-1902.
- **Creamer, L. K.**, L. Sawyer. 2002. Beta-lactoglobulin. En Roginsky, H., J. W. Fuquay, P. F. Fox (ed.), Encyclopedia of Dairy Sciences. Londres, Reino Unido. Academic Press. Vol 3, pp 1932-1938.
- **Cushman, D. W.**, H. S. Cheung. 1970. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochemical Pharmacology. 20:1637-1648.
- **Fernández-Espla, M.D.**, F. Rul. 1999. PepS from *Streptococcus thermophilus* a new member of the aminopeptidase T family of thermophilic bacteria. European Journal of Biochemistry. 263:502-510.
- **Fiat, A. M.**, D. Migliore-Samour, P. Jollès. 1993. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. Journal of Dairy Science. 76:301-310.
- **Fitzgerald, R. J.**, B. A. Murray. 2006. Bioactive peptides and lactic fermentations. International Journal of Dairy Technology. 59(2):118-126.
- **Foegeding, E. A.**, Luck, P.J. 2002. Whey protein products. En Roginsky, H., J. W. Fuquay, P. F. Fox (ed.), Encyclopedia of Dairy Sciences. Londres, Reino Unido. Academic Press. Vol 3, pp 1957-1960.
- **Freedman, R. B.**, G. K. Radda. 1968. The reaction of 2, 4, 6 trinitrobenzenesulphonic acid with amino acids, peptides and proteins. Biochemistry Journal. 108: 383-391.

- **Fuglsang, A.**, D. Nilsson, N. C. B. Nyborg. 2002. Cardiovascular effects of fermented milk containing angiotensin-converting enzyme inhibitors evaluated in permanently catheterized, spontaneously hypertensive rats. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(7):3566-3569.
- **Garault, P.**, C. Letort, V. Juillard, V. Monnet. 2000. Branched-chain amino acid biosynthesis is essential for optimal growth of *Streptococcus thermophilus* in milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(12):5128-5133.
- **Gobbetti, M.**, P. Ferranti, E. Smacchi, F. Goffredi, F. Addeo. 2000. Production of Angiotensin-I-Converting-Enzyme-Inhibitory Peptides in Fermented Milks Started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(9):3898-3904.
- **Haggarty N. W.** 2002. Minor proteins, bovine serum albumin and vitamin-binding protein. En Roginsky, H., J. W. Fuquay, P. F. Fox (ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Londres, Reino Unido. Academic Press. Vol 3, pp 1939-1946.
- **Hernandez-Ledesma, B.**, B. Miralles, L. Amigo. M. Ramos, I. Recio. 2005. Identification of and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85:1041-1048.
- **Hong, F.**, L. Ming, S. Yi. L. Zhanxia, W. Yongquan, L. Chi. 2008. The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs?. *Peptides*. 29(6):1062-1071.
- **Jackson, C. V.**, V. G. Crowe, J. D. Frank, H. C. Wilson, W. J. Coffman, B. G. Utterback, J. A. Jakubowski, G. F. Smith. 1992. Pharmacological assessment of the antithrombotic activity of the peptide thrombin inhibitor, D-methyl-phenylalanyl-prolyl-arginal (GYKI-14766), in a canine model of coronary artery thrombosis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 261(2):546-552.
- **Jesse, F.**, S. Y. Choil. 1970. Quantification of protein solutions with trinitrobenzensulfonic acid. *Clinical Chemistry*. 16(1): 24-31.
- **Jolles, P.**, S. Levy-Toledano, A. M. Fiat, G. Soria, D. Gillessen, A. Thomaidis, F. W. Dunn, J. P. Caen. 1986. Analogy between fibrinógeno and casein. Effect of aundcapeptide isolated from κ -caseína on platelet function. *European Journal of Pharmacology*. 158: 379-382.
- **Kandler, O.**, N. Weiss. 1986. Section 14 regular, nonsporing Gram-positive rods. En Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. Holt (ed), *Bergeys's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore E.U.A. Williams & Wilkins. Vol 2, pp 1208-1234.

- **Korhonen, H.**, P. Marnila. 2002. Lactoferrin. En Roginsky, H., J. W. Fuquay, P. F. Fox (ed.), Encyclopedia of Dairy Sciences. Londres, Reino Unido. Academic Press. Vol 3, pp 1950-1956.
- **Korhonen, H.**, A. Pihlanto. 2006. Bioactive peptides: production and functionality. International Dairy Journal. 16: 945-960.
- **Kunji, E.R.S.**, I. Mierau, A. Hagting, B. Poolman, W. N. Konings. 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhock. 70:187-221.
- **Letort, C.**, M. Nardi, P. Garault, V. Monnet, V. Juillard. 2002. Casein utilization by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk. Applied and Environmental Microbiology. 68:3162-3165.
- **Limsowtin, G.K.Y.**, M.C. Broome, I.B. Powell. 2002. Lactic acid bacteria, taxonomy. En Roginsky, H., J. W. Fuquay, P. F. Fox (ed.), Encyclopedia of Dairy Sciences. Londres, Reino Unido. Academic Press. Vol 3, pp 1470-1478.
- **Marnila, P.**, H. Korhonen. 2002. Immunoglobulins. En Roginsky, H., J. W. Fuquay, P. F. Fox (ed.), Encyclopedia of Dairy Sciences. Londres, Reino Unido. Academic Press. Vol 3, pp1946-1950.
- **Matar, C.**, J. Amito, L. Savoie, J. Goulet. 1996. The effect of milk fermentation by *Lactobacillus helveticus* on the release of peptides during *in vitro* digestión. Journal of Dairy Science. 79:971-979.
- **Meisel, H.** 1997. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potencial nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. Livestock Production Science. 50:125-138.
- **Meisel, H.** 2004. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. Bio Factors. 21: 55-61.
- **Meisel, H.**, R.J. FitzGerald. 2003. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. Current Pharmaceutical Design. 9: 1289-1295.
- **Miles, A.A.**, S.S. Misra. 1938. the estimation of bactericidal power of the blood. Journal of Higiene. 38:732-749.
- **Mollet, B.**, I. Rowland. 2002. Functional foods:at the frontier between food and pharma. Current Opinión in Biotechnology. 13:483-485.
- **Moreira, M.**, A. Abraham, G. De Antoni. 2000. Technological properties of milks fermented with termophilic lactic acid bacteria at suboptimal temperature. Journal of Dairy Science. 83:395-400.

- **Morishita, T.**, Y. Deguchi. 1999. Section 4 nutrition and metabolism. En Yakult Central Institute For Microbiological Research (ed.), *Lactobacillus casei* strain Shirota. Tokio, Japón. Yakult Honsha Co. Ltd. pp 38-52.
- **Nakamura, Y.**, N. Yamamoto, K. Sakai, T. Takano. 1995. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Dairy Science*. 78:1253-1257.
- **Ng-Kwai-Hang, K. F.** 2002. Heterogenety and isolation. En Roginsky, H., J. W. Fuquay, P. F. Fox (ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Londres, Reino Unido. Academic Press. Vol 3, pp 1881-1894.
- **Otte, J**; S. Shalaby, M. Zakora, M. Nielsen. 2007. Fractionation and identification of ace-inhibitory peptides from α -lactalbumin and β -casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. *International Dairy Journal*. 17:1460-1472.
- **Pearce, L.**, S. Flint. 2002. *Streptococcus thermophilus*. En Roginsky, H., J. W. Fuquay, P. F. Fox (ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Londres, Reino Unido. Academic Press. Vol 4, pp 2577-2582.
- **Pihlanto, A.**, H. Korhonen. 2003. Bioactive peptides and proteins. *Advances in Food and Nutrition Research*. 47:175-249.
- **Pihlanto, A.** 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*. 16: 1306-1314.
- **Rajagopal, S. N.**, W. E. Sandine. 1990. Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk. *Journal of Dairy Science*. 73:894-899.
- **Salminen, S.**, M. Deighton, S. Gorbach. 1993. Lactic acid bacteria in health and disease. En Salminen, S., A. von Wright (ed.), *Lactic acid bacteria*. Baltimore, E.U.A. Marcel Dekker. pp 199-225.
- **Schaffer, L. W.**, J. T Davidson, G. P. Vlasuk, P. K. S. Siegl. 1991. Antithrombotic efficacy of recombinant tick anticoagulant peptide, a potent inhibitor of coagulation factor Xa in a primate model of arterial trombosis. *Circulation*. 84: 1741-1748.
- **Schägger, H.**, G. Von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-poliacrilamide gel electroforesis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*. 166 (2): 368-379.
- **Schanbacher, F. L.**, R. S. Talhouk, F. A. Murray. 1997. Biology and origin of bioactive peptides in milk. *Livestock Production Science*. 50:105-123.
- **Schlimme, E.**, H. Meisel, H. Frister. 1990. Bioactive sequences in milk proteins. En Barth, C. A., E. Schlimme (ed.), *Milk Proteins: Nutricional, Clinical, Functional and Technological Aspects*. New York, E.U.A. Ed. Springer-Verlag. pp 43.

- **Shah, N. P.** 2000. Effects of milk-derived bioactives: an overview. *British Journal of Nutrition*. 84:s3-s10.
- **Shahbal S., D. Hemme, M. Desmazeaud.** 1991. High cell wall-associated proteinase activity of some *Streptococcus* strains (H-strains) correlated with high acidification rate in milk. *Lait*. 71:351-357
- **Shalaby, S. M., M. Zakora, J. Otte.** 2006. Performance of two commonly used angiotensin-converting enzyme inhibition assays using FA-PGG and HHL as substrates. *Journal of Dairy Research*. 73:178-186.
- **Sindayikengera, S., X. Wenshui.** 2005. Milk biologically active components as nutraceuticals: review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45:645-656.
- **Stelwagen, K.** 2002. Milk protein. En Roginsky, H., J. W. Fuquay, P. F. Fox (ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Londres, Reino Unido. Academic Press. Vol 3, pp 1835-1841.
- **Takahashi, M.** 1999. Section 3 morphology and structure. En Yakult Central Institute For Microbiological Research (ed.), *Lactobacillus casei* strain Shirota. Tokio, Japón. Yakult Honsha Co. Ltd. pp 23-30.
- **Watanabe, T., A. Mike.** 1999. Section 2 taxonomy. En Yakult Central Institute For Microbiological Research (ed.), *Lactobacillus casei* strain Shirota. Tokio, Japón. Yakult Honsha Co. Ltd. pp 3-23.
- **Yamamoto, N., A. Akino, T. Takano.** 1994. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science*. 77:917-922.
- **Yamamoto, N., M. Maeno, T. Takano.** 1999. Purification and characterization of an antihypertensive Peptide from a Yogurt-like product fermented by *Lb. helveticus* CPN4. *Journal of Dairy Science*. 82:1388-1393.
- **Zhang, Y., Breyer, K.** 2002. Alpha-lactalbumin. En Roginsky, H., J. W. Fuquay, P. F. Fox (ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press. Londres, Reino Unido. Vol 3, pp 1924-1931.

10. Apéndice

10.1. Preparación de reactivos

10.1.1. Medios de cultivo

- Leche 10%

Se agregaron 30 g de leche a 300 mL de agua destilada, se disolvieron completamente y se esterilizó a 121° C por 15 minutos.

- Caseína 3%

9 g de caseína

15 g de lactosa (concentración final de 5%)

3.51 g de YCB (concentración final de 1.17%)

Se agregan 300 mL de agua destilada se diluye por completo subiendo el pH a 7.5 (con hidróxido de sodio 10 N) y posteriormente se calienta a 90° C por 30 minutos.

- Suero de leche 3%

25.5 g de WPC 34 (Whey Protein Concentrate) (8.67 g de proteína de suero de leche)

3.51 g de YCB (concentración final de 1.17%)

Se agregan 300 mL de agua destilada se diluye por completo y posteriormente se calienta a 60° C por 30 minutos.

10.1.2. Soluciones del método de TNBS

- Amortiguador de fosfatos 0.2125 M, pH 8.2

9.2525 g de fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) aforado a 250 mL.

1.4460 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) aforado a 50 mL.

Se agrega el fosfato de potasio monobásico al fosfato de potasio dibásico hasta alcanzar el pH de 8.2.

- Solución de ácido clorhídrico 0.1 N

0.970 mL de ácido clorhídrico (HCl) 10.3 N aforado a 100 mL.

- Solución de ácido TNBS 0.10 %

0.05 mL de TNBS aforado a 50 mL de amortiguador de fosfatos 0.2125 M pH 8.2.

10.1.3. Soluciones de electroforesis (SDS-PAGE)

- Solución stock de acrilamida 49.5% T, 3% C (acrilamida 48%, bis-acrilamida 1.5%)

24 g de acrilamida y 0.75 g de bis-acrilamida aforados a 50 mL de agua desionizada.

- Solución amortiguadora del gel Tris 3 M, SDS 0.3%, pH 8.45

36.342 g de Tris y 0.3 g de SDS aforado a 100 mL de agua desionizada.

Antes de aforar por completo se ajusta el pH a 8.45 con HCl concentrado y finalmente se afora.

- Persulfato de amonio 10 %

10 mg de persulfato de amonio aforado a 100 μ L de amortiguador del gel.

- Solución amortiguadora del cátodo Tris 0.1 M, Tricina 0.1 M, SDS 0.1%, pH 8.25

12.114 g de Tris, 17.917 g de Tricina y 1 g de SDS aforados a 1 L de agua desionizada.

El pH de la solución se ajusta con HCl antes de aforar por completo.

- Solución amortiguadora del ánodo Tris 0.2 M, pH 8.9

24.228 g de Tris aforado a 1 L de agua desionizada.

El pH de la solución se ajusta con HCl antes de aforar por completo.

- Solución amortiguadora de la muestra

SDS 4%	0.2 g
Glicerol 12% w/v	0.476 mL
Tris 0.05 M	0.303 g
Azul de comassie 0.01%	0.050 ml (1%)
B-mercaptoetanol 2%	0.1 mL
Agua desionizada	4.374 mL
Volumen final	5 mL

Los reactivos sólidos se pesan y al final quedan en la concentración señalada en la tabla; de igual manera los reactivos líquidos se agregan y en el volumen final quedan con la concentración deseada. Para preparar la solución al 1% de azul de comassie se pesan 0.01 g, se aforan a 1 mL de agua desionizada.

- Solución fijadora (50% metanol, 10% de ácido acético)

500 mL de metanol y 100 mL de ácido acético aforados a 1L con agua desionizada.

- Solución teñidora (0.025% azul de comassie en 10% de ácido acético)

10 mL de ácido acético aforado a 100 mL con agua desionizada.

0.025 g de azul de comassie aforado a 100 mL con ácido acético 10%.

- Solución desteñidora (10% de ácido acético)

10 mL de ácido acético aforado a 100 mL con agua desionizada.

10.1.4. Soluciones para la determinación de antihipertensivos

- Solución amortiguadora de borato 0.1 M, 0.3 M cloruro de sodio (NaCl) pH 8.3.; amortiguador del sustrato, hipuril histidil leucina (HHL) 5 mM .

61.8 mg de ácido bórico (H_3BO_3) y 175.3 mg de NaCl aforado a 10 mL.

Para preparar la solución con sustrato se toma en cuenta el volumen que se vaya a necesitar, para preparar 2 mL: 4.3 mg de HHL aforados a 2 mL de amortiguador de borato 0.1 M pH 8.3

- Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 8.3

0.174 g de fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) aforado a 10 mL.

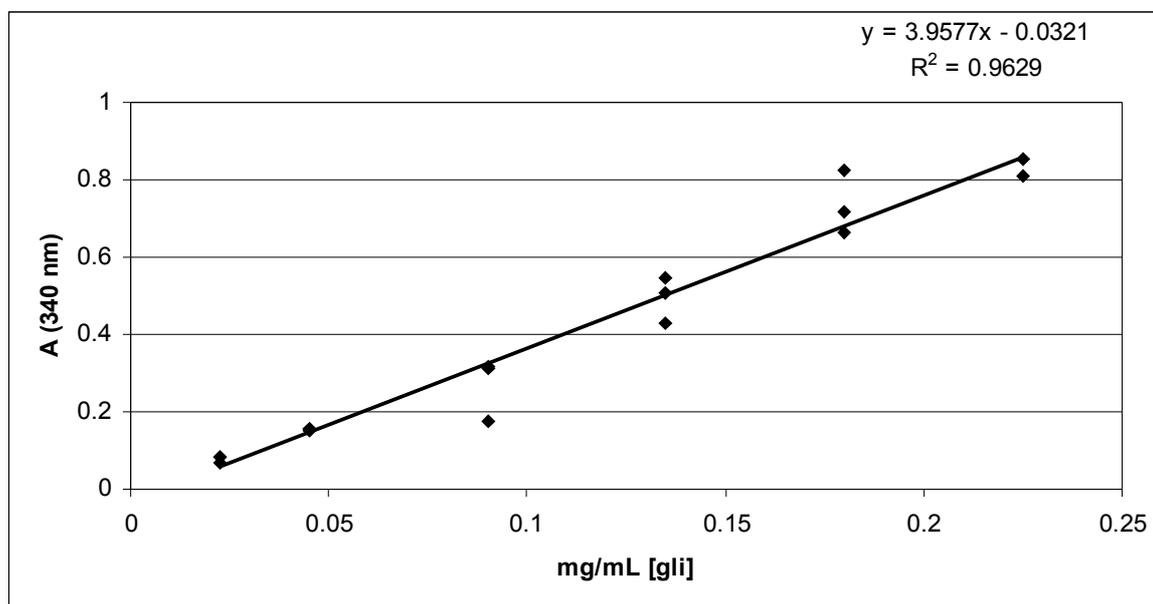
0.136 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) aforado a 10 mL.

Se agrega el fosfato de potasio monobásico al fosfato de potasio dibásico hasta alcanzar el pH de 8.3.

Para preparar la enzima (ésta se encuentra liofilizada) se toma en cuenta las unidades por gramo de sólido: 5.5 unidades /mg de sólido, 0.25 mg de sólido son 1.375 unidades totales; esto se resuspende en 1.375 mL para tener 1U/mL.

10.2. Curvas patrón

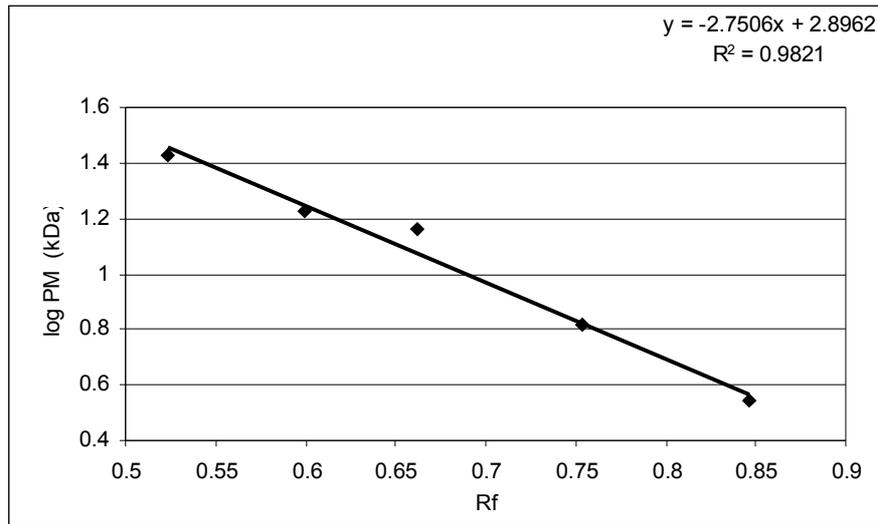
10.2.1. Curva patrón del método de TNBS



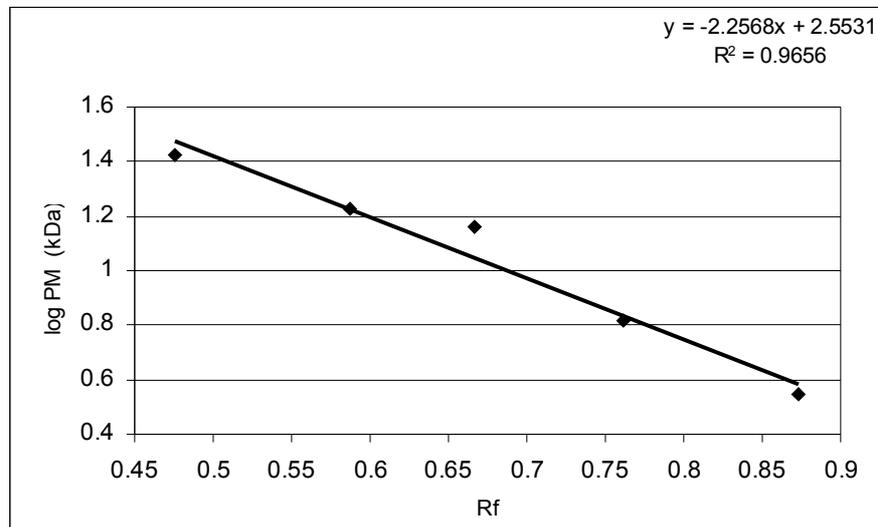
Gráfica 10.1 Curva patrón para TNBS de glicina.

10.2.2. Curvas patrón para determinación de pesos moleculares, BioRad (electroforesis)

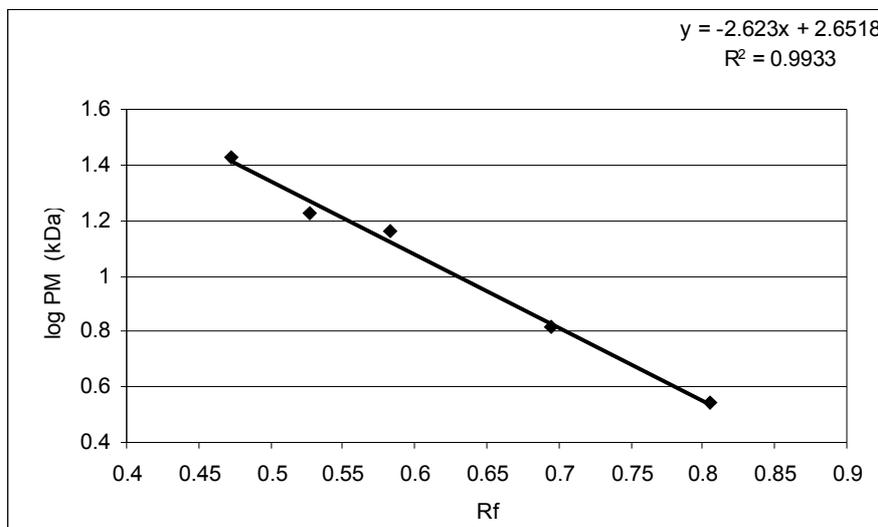
Tabla 10.2 Estándar de polipéptidos(pesos moleculares, kDa)	
Triosa fosfato isomerasa	26.625
Mioglobina	16.950
α -lactoalbumina	14.437
Aprotinina	6.517
Insulina b, oxidasa	3.423



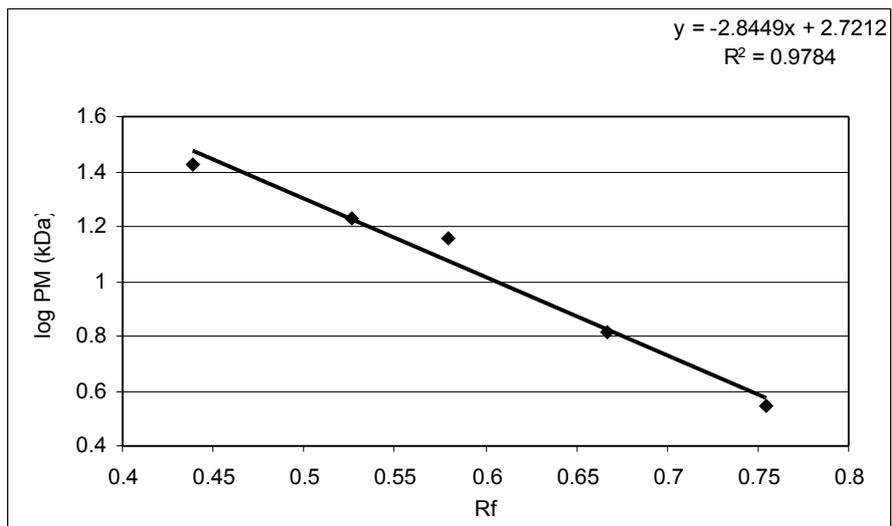
Gráfica 10.2 Curva patrón de electroforesis para las muestras de la fermentación en leche con *Lactobacillus casei*.



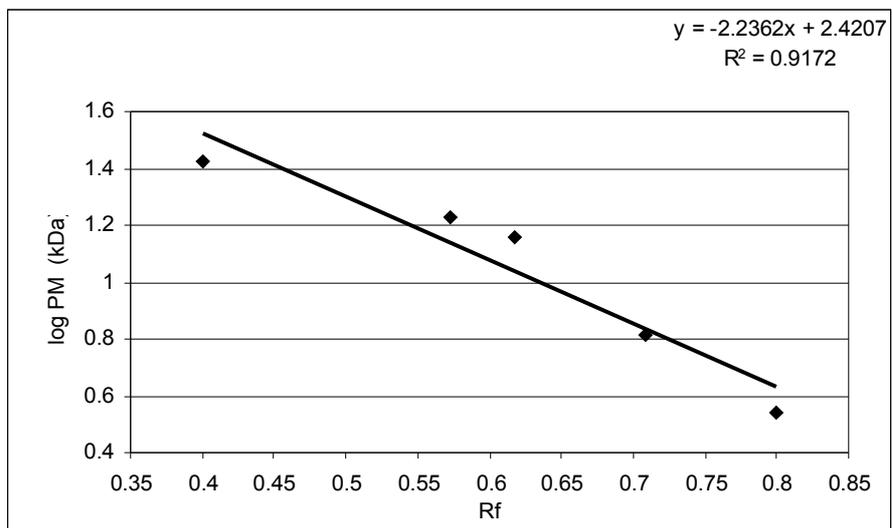
Gráfica 10.3 Curva patrón de electroforesis para las muestras de la fermentación en leche con *Streptococcus thermophilus*.



Gráfica 10.4 Curva patrón de electroforesis para las muestras de la fermentación en leche con el cultivo mixto.



Gráfica 10.5 Curva patrón de electroforesis para las muestras de la fermentación en caseínas con *Lactobacillus casei*.



Gráfica 10.6 Curva patrón de electroforesis para las muestras de la fermentación en caseínas con *Streptococcus thermophilus*.

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

**Perfil de producción de péptidos bioactivos durante la fermentación de leche por
Lactobacillus casei y *Streptococcus thermophilus***

Que presentó

Ing. María Rebeca Rojas Ronquillo

Director:

Dr. J. Mariano García Garibay

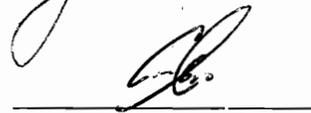


Jurado:

Dr. Jorge Soriano Santos (Presidente)



Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero (Secretario)



M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz



Dra. Carmen Wachter Rodarte

