

Identificación de Péptidos con Propiedades Funcionales en un Producto Lácteo Fermentado (Sofúl)

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Biotecnología

PRESENTA

I. A. Karina Nataly Domínguez González

DIRECTOR:

Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano

ASESORES:

M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz

Dr. Humberto González Márquez

Marzo 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:

Identificación de Péptidos con Propiedades Funcionales en un Producto Lácteo Fermentado (Sofúl)

Que presentó

I. A. Karina Nataly Domínguez González

Director:

Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano

Jurado:

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero (Presidente)

Dr. Jorge Soriano Santos (Secretario)

Dr. Humberto González Márquez (Vocal)

M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz (Vocal)

Dedicatorias

Este trabajo está dedicado a mis padres Ma. de los Angeles y Fermin, quienes siempre me enseñaron a luchar por lo quiero sin importar los obstáculos a vencer. Su tiempo, apoyo y enseñanzas me hicieron la persona que soy ahora. Los amo.

A mi hermano Toño, por todos los consejos que me has dado cuando más los necesite. Gracias por ayudarme a crecer como persona y ser humano, eres un ser humano excepcional. Te amo.

A mis sobrinas Yarazet y Ariadna ya que su cariño a pesar de la distancia me sirvió para realizar mis metas. Las quiero muchísimo mis niñas

A mis hermanas Mary, Estefy y Carmen y a mis primos Luis y Carlos, gracias a su cariño y apoyo incondicional que siempre me han dado. Los quiero mucho.

A mi directora de tesis Dra. Gabriela Rodríguez, por todo su apoyo y consejos brindados durante la realización de este trabajo, es una gran persona

A mis amigos por todos los momentos y experiencias que han enriquecido nuestra amistad, los quiero mucho. Gracias Ramsi, Bky y Oli por todo el apoyo que me dieron cuando más lo necesitaba; Moni, Mariana y Richi por enseñarme que si hay amigos que pueden durar toda una vida, Armand, Javi e Isra por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas.

Agradecimientos

A mi directora, Dra. Gabriela Rodríguez, a quien le agradezco todo su tiempo y dedicación para poder realizar este proyecto. Muchísimas gracias por todo pero sobre todo por creer en mí, es una gran persona. Es un placer el poder seguir trabajando con usted.

Al Dr. Humberto González que a pesar del poco tiempo compartido siempre sus consejos, su tiempo y dedicación estuvieron presentes y sirvieron de mucho para el enriquecimiento de este trabajo. Muchas gracias.

A la M. en C. Lorena Gómez, Dra. Alma Cruz, Dr. Mariano García y Dra. Judith Jímenez cuyos consejos enriquecieron este trabajo, gracias por el tiempo brindado, esto no hubiera sido posible sin su apoyo.

Al Dr. Jorge Soriano por sus consejos y el tiempo brindado. Muchas gracias por su tiempo y comprensión.

A Angie y Bky gracias por todo su apoyo durante la realización del trabajo. Son unas chicas geniales nunca cambien.

A mis compañeros de la planta piloto, gracias a todo su apoyo para el enriquecimiento de mi persona.

RESUMEN

El objetivo de éste trabajó fue el estudiar un producto lácteo fermentado (Sofúl) por las bacterias ácido lácticas *Streptococcus thermophillus* y *L. casei Shirota* (probiótico) con la finalidad de encontrar péptidos derivados de las proteínas de la leche que puedan presentar actividad antihipertensiva y su comportamiento durante el almacenamiento del producto.

Para ello, se llevó a cabo un análisis en el sobrenadante del producto por un periodo de veinte días de almacenamiento antes de su fecha de caducidad. A las muestras tomadas a lo largo del almacenamiento se les determinó la concentración de grupos amino libres por el método de TNBS (Adler, 1979), la concentración de proteína por el método de Lowry (Lowry y col., 1951), actividad antihipertensiva mediante el método de Fuglsang (2003), así como un análisis por electroforesis (nativa y desnaturalizante de péptidos) y por HPLC (gel filtración y fase reversa).

Los resultados obtenidos mostraron que a lo largo del almacenamiento hubo actividad antihipertensiva constante (26.8% ± 5.4%); sin diferencias significativas en el contenido de grupos amino libres, en el contenido de proteína ni en el de actividad antihipertensiva, lo cual nos indicó que durante el almacenamiento no se ve reflejada una proteolisis a pesar del aumento de biomasa durante el almacenamiento. Posteriormente, las muestras se analizaron por electroforesis nativa en la cual se observaron péptidos de peso molecular inferior al de las proteínas de la leche. Finalmente al analizar estas muestras por HPLC, se observó que el sobrenadante del producto está compuesto por péptidos de diferente peso molecular y que algunas fracciones colectadas presentan mayor actividad antihipertensiva que otras. Tal es el caso de la fracción 3, la cual presentó una mayor actividad antihipertensiva constante en comparación con las fracciones 1 y 5.

ABSTRACT

The aim of this work was to study a dairy product was fermented by lactic acid bacteria *Streptococcus thermopillus* and *L. casei Shirota* (probiotic) in order to find peptides derived of milk proteins that could have antihypertensive activity and their changes during the storage of the product.

For that, the extract was analyzed during twenty days of storage before its expiration day. These samples were collected during the storage and were analyzed by TNBS method (Adler 1979) to determinate the concentration of primary amino groups, protein concentration by Lowry method (Lowry y col. 1951), antihypertensive activity by Fuglsang method (2003), and were analyzed by electrophoresis (native and SDS-PAGE-TRICINE) and by HPLC (gel permeation and reversed-phase chromatography).

The results showed that during the storage the antihypertensive activity was constant without significative differences in the concentration of primary amino groups, protein concentration neither antihypertensive activity, which indicate that a proteolysis is not reflect although the rise on biomase during the storage. After all, samples were analyzed by native electrophoresis showed peptides with a lowest molecular weight than milk proteins. Finally by HPLC the extract showed a mixture of peptides of different molecular weight. Some fractions, presented bigger activity than others. In this case the fraction 3 presented the biggest antihypertensive activity than fractions 1 and 5.

ÍNDICE

1 Introducción 1

2 Justificación 3

3 Antecedentes 4

3.1 Leche 4

3.1.1 Proteínas de la Leche 6

3.1.1.1 Caseínas 7

3.1.1.2 Proteínas del Suero de la leche 8

3.2 Bacterias Ácido Lácticas 9

3.2.1 Sistema Proteolítico de las Bacterias Ácido Lácticas 11

3.2.1.1 Proteinasas 11

3.2.1.2 Sistema de Transporte de Aminoácidos y Péptidos 12

3.2.1.3 Peptidasas 13

3.2.1.4 Regulación del Sistema Proteolítico 15

3.3 Bacterias Probióticas 16

3.3.1 Lactobacillus 19

3.3.2 Streptococcus 21

3.4 Leches Fermentadas 22

3.5 Péptidos Bioactivos 23

3.5.1 Péptidos Opioides 24

3.5.1.1 Características generales 25

3.5.2 Péptidos Inmunomoduladores 26

3.5.2.1 Péptidos inmunomoduladores derivados de Caseína α_{S1} . 26

3.5.2.2 Péptidos inmunomoduladores derivados de Caseína β 27

3.5.2.3 Péptidos inmunomoduladores derivados de Caseína K.... 27

3.5.3 Péptidos Transportadores de Minerales 27

3.5.4 Péptidos Antitrombóticos 28

3.5.5 Péptidos Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ACE) 29

3.5.6 Péptidos Antimicrobianos 33

3.5.7 Péptidos con otras actividades biológicas 34

3.5.7.1 Péptidos Citomoduladores 34

3.5.7.2 Péptidos Antioxidantes 34

3.6 Alimentos Funcionales 35

4 Hipótesis 40

5 Objetivos 40

5.1 Objetivo General 40

5.2 Objetivos Particulares 40

6 Metodología 41

6.1 Toma de Muestra 41

6.2 Recuento microbiano 42

6.3 Determinaciones 42

6.3.1 Proteína por el Método de Lowry 42

6.3.2 Grupos Amino Libres por el método del Ácido Trinitrobencensulfonico (TNBS) 43

6.4 Electroforesis SDS-PAGE-TRICINA 45

6.5 Prueba in vitro de Actividad Antihipertensiva 48

6.6 Calculo de la concentración inhibitoria media (IC50) 52

6.7 Fraccionamiento de péptidos por exclusión molecular – HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución) y RP-HPLC (Fase Reversa HPLC) . 52

7 Resultados 55

8 Conclusiones 68

9 Perspectivas 69

10 Anexos 70

10.1 Curvas Patrón 70

10.1.1 Curva Patrón de Glicina 3mM 70

10.1.2 Curva Patrón de Seroalbúmina 100-500 μg/mL 71

11 Bibliografía 72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Macro y micronutrientes de la leche de vaca 5

Tabla 2. Concentración y Funciones Biológicas de las Principales Proteínas de la Leche 6

Tabla 3. Géneros de las Bacterias Ácido Lácticas 10

Tabla 4. Clasificación de las leches fermentadas de acuerdo con el tipo de su flora dominante 23

Tabla 5. Tipos de modificaciones para la obtención de alimentos funcionales 36

Tabla 6. Alimentos funcionales disponibles comercialmente e ingredientes alimenticios que contienen péptidos bioactivos 38

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo propuesto del sistema proteolítico de *Lactococcus lactis*. 14

Figura 2. Sistema de Transporte de Oligopéptidos Opp. 15

Figura 3. Regulación del Sistema Proteolítico de *Lactococcus*. 16

Figura 4. Diseño experimental para el análisis de los péptidos bioactivos del Sofúl. 41

Figura 5. Reacciones catalizadas por la Enzima Convertidora de Angiotensina (ACE).. 48

Figura 6. Hidrólisis de Hipurril-Histidil-Leucina, sustrato usado para la medición de la actividad antihipertensiva. 50

Figura 7. pH del producto lácteo fermentado (Sofúl) durante el almacenamiento. 55

Figura 8. Microorganismos viables del producto lácteo fermentado (Sofúl) durante su almacenamiento durante 20 días a 4°C 56

Figura 9. Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ACE) por el producto lácteo fermentado (Sofúl) durante el almacenamiento 57

Figura 10. Concentración de grupos amino libres del producto lácteo fermentado (Sofúl) durante el almacenamiento 58

Figura 11. Concentración de Proteína del producto lácteo fermentado (Sofúl) durante el almacenamiento 58

Figura 12. Electroforesis Nativa del producto lácteo fermentado (Sofúl) durante el almacenamiento.. 59

Figura 13. Electroforesis SDS-PAGE-TRICINA del producto lácteo fermentado (Sofúl) durante el almacenamiento. 60

Figura 14. Cromatograma del producto lácteo fermentado (Sofúl) durante el almacenamiento por exclusión molecular HPLC 61

Figura 15. Cromatograma de las fracciones encontradas en el producto lácteo fermentado (Sofúl). 62

Figura 16. Actividad antihipertensiva normal y especifica de las fracciones 1(11.52 kDa), 3(6.96 kDa) y 5(□1.42 kDa), encontradas en el sobrenadante del producto. 63

Figura 17. Análisis de las concentraciones de F1, F3 y F5 al inicio y final del almacenamiento por RP-HPLC 65

Figura 18. Concentración de grupos amino libres del producto vs. Porcentaje de inhibición de ACE. 66

1 Introducción

Durante las últimas décadas hemos vivido un resurgimiento del interés por todo lo natural debido especialmente a la conciencia pública que se ha generado alrededor de los productos alimenticios seguros y saludables. Nunca antes se había centrado tanto la atención en los efectos benéficos de los alimentos como ahora. La idea de que los alimentos pueden ser promotores de salud más allá de su valor nutricional tradicional está ganando terreno entre los científicos y profesionales de la salud (Vioque y Millán, 2005).

El concepto de componente bioactivo y su relación con los alimentos no es una idea nueva, aunque sí lo es el hecho de querer explotar su potencial y conocer las bases científicas de su modo de acción. Un componente bioactivo es un compuesto químico que ejerce un efecto benéfico para alguna función corporal del individuo al producir una mejora en su salud y bienestar o al reducir un riesgo de enfermedad (Vioque y Millán, 2005).

La leche contiene un gran número de sustancias biológicamente activas; las cuales confieren propiedades especiales para el desarrollo y crecimiento del infante más alla de la nutrición básica. Muchas de las bioactividades de la leche son atribuidas a las proteínas y péptidos que se encuentran en la leche (Pihlanto-Leppälä, 2001).

Las proteínas representan uno de los componentes principales de los alimentos, tanto desde un punto de vista funcional como nutrimental. Por ejemplo, los componentes proteicos de la leche proveen protección inmunológica y sustancias biológicamente activas tanto para recién nacidos como para adultos. Las fracciones de proteínas mayores en leche bovina incluyen caseínas, inmunoglobulinas, lactoferrina, α-lactoalbumina, β-lactoglobulina y proteínas menores de suero tales como transferrina y seroalbumina (Clare y Swaisgood, 2000).

El conocimiento de las proteínas como componentes biológicamente activos se está incrementando. Muchas de las proteínas que se encuentran de forma natural en los alimentos ejercen su acción fisiológica directamente o después de una hidrólisis enzimática *in vivo* o *in vitro,* por lo que recientemente se ha reconocido a las proteínas alimentarias por ser una fuente rica de péptidos biológicamente activos (Korhonen y Pihlanto, 2006). Los péptidos son secuencias inactivas cuando se encuentran dentro de la secuencia de la proteína nativa, pero pueden ser liberados por hidrólisis enzimática, durante la digestión gastrointestinal o durante el proceso de transformación del alimento, por ejemplo por fermentación con algún microorganismo (Hosono, 2002).

Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos de tamaño pequeño, entre 2 y 15 aminoácidos que presentan actividad moduladora de numerosos procesos metabólicos del organismo (Vioque y Millán, 2005). Se ha reportado que algunos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, donde podrían alterar el metabolismo celular y actuar como vasoreguladores, factores de crecimiento, inductores hormonales o neurotransmisores Aunque los péptidos bioactivos pueden obtenerse a partir de proteínas de diverso origen, se producen principalmente a partir de las proteínas de la leche y se han encontrado en derivados de ésta como quesos y leches fermentadas, donde uno de sus beneficios fisiológicos ha sido considerado el hecho de poseer un efecto inmunomodulatorio en el sistema inmune; así los componentes inmunomodulatorios de las leches fermentadas se dividen en dos orígenes principales: Los componentes de la leche o sus productos metabólicos y los microorganismos iniciadores con los que el producto lácteo fue fermentado (Jiménez y col., 2001; Hosono, 2002).

Sin duda, a medida que continúan las investigaciones, nuevos péptidos serán descritos y otros efectos benéficos serán atribuidos (Kunji y col., 1996). Así el campo de los péptidos bioactivos es altamente prometedor en el área de los alimentos funcionales; por ello existe un gran interés por parte del consumidor, la industria alimentaria y la comunidad científica.

2 Justificación

Actualmente, encontrar alimentos saludables es relativamente fácil, pero que éstos sean saludables y apetecibles es el verdadero reto. Esto es debido a que los alimentos son una parte importante de la vida diaria de cada persona y por siglos el placer de los alimentos se ha desarrollado, llegando a ser un deleite de la vida. Esto provoca que los consumidores, que han podido escoger de entre una amplia gama de alimentos, no les será fácil abandonar el sabor, olor y textura simplemente por salud.

El factor principal que contribuye al continuo crecimiento de la oferta y la demanda de alimentos funcionales es el incremento en la prevalencia de la desregulación metabólica en la población, principalmente obesidad, arterioesclerosis, diabetes e hipertensión. Las causas y consecuencias de enfermedades metabólicas son diferentes para cada individuo. Es claro que el metabolismo se encuentra estrechamente relacionado con la dieta y el estilo de vida de cada persona, por lo que cambios en la alimentación puede ser la clave para resolver o aminorar estos problemas, es por estas razones que se han realizado muchos estudios enfocados en demostrar que los péptidos producto de la hidrólisis de las proteínas de los alimentos presentan bioactividad, principalmente, pero no únicamente, en las proteínas de la leche, ya que ésta es una fuente importante de péptidos bioactivos.

Péptidos derivados de las caseínas ya han sido considerados como suplementos alimenticios y éstos pueden manufacturarse a escala industrial. De hecho, ya se han propuesto péptidos específicos como suplementos para algunos alimentos; como es el caso de los fosfopéptidos de las caseínas, que pueden actuar como acarreadores de metales y se adicionan a harina, pan, bebidas, goma de mascar, y algunas preparaciones farmacéuticas como tabletas, pasta de dientes y material para relleno dental (Meisel, 1997).

Rokka y col. (1997) aislaron péptidos de leches fermentadas con *Lactobacillus GG*, y los sometieron a un tratamiento posterior con pepsina y tripsina. Los péptidos obtenidos se analizaron por FPLC y por espectrometría de

masas, encontrando péptidos antihipertensivos, inmunomoduladores y opioides. Perpetuo y col. (2003) realizó un estudio con HPLC, en especifico de dos péptidos potenciadores de bradiquinina (un potente vasodilatador) f(108-113) y f(114-121), obtenidos de la hidrólisis de caseína. Ledesma y col. (2004) midieron la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de Angiotensina-I (ACE) en algunos productos fermentados comerciales así como la formación de péptidos bajo la estimulación de digestión gastrointestinal. Por ello, el estudio de leches fermentadas y otros productos ha sido de gran interés para la industria alimentaria y la comunidad científica, enfocándose en los compuestos bioactivos que aporten un efecto benéfico a la salud.

3 Antecedentes

3.1 Leche

Se define como líquido que se produce en las glándulas mamarías de hembras sanas recién paridas, poco después del calostro. Su composición es compleja, de color blanco y opaco, de sabor ligeramente dulce y de pH casi neutro. La función primordial de la leche es la de alimentar a las crías durante el periodo posterior al nacimiento, cuando el desarrollo es rápido y es difícil sustituirlo por otro alimento (Santos, 1987). La leche es una mezcla compleja de macro y micronutrientes (Tabla 1) como lactosa, lípidos, proteínas, sales minerales, vitaminas, etc. que coexisten como emulsión (capa de glóbulos grasos), suspensión (caseínas y sales minerales) y solución. Estas sustancias (proteínas, péptidos, lípidos, vitamina D y minerales) por ejemplo pueden influenciar la presión sanguínea ayudando asís a mantener una buena salud (Groziak, 2000).

Tabla 1. Macro y micronutrientes de la leche de vaca

Proteínas de Suero
Péptidos derivados de las Caseínas
Péptidos derivados del Suero
Calcio biodisponible
Oligosacáridos
Ácido linoleico conjugado (CLA)
Enzimas

Ahora se conoce a la leche por ser más que un producto nutrimental con la propiedad de proporcionar inmunidad pasiva al joven lactante, también como una fuente de compuestos bioactivos que provocan diversos efectos en el hijo. Estos compuestos incluyen moduladores de las funciones gastrointestinales, moduladores hemodinámicos, hormonas y factores de crecimiento, probablemente involucrados en el desarrollo del tracto gastrointestinal, inmunoregulación, defensa inmune a enfermedades y control microbiano (Schanbacher y col., 1997). Así, las investigaciones realizadas durante los últimos 30 años, han demostrado que la leche y los productos lácteos pueden ayudar a prevenir o reducir cierto tipo de desordenes crónicos como osteoporosis, hipertensión, obesidad, sobrepeso y cáncer de colon, entre otros.

Es importante mencionar que el valor de los productos lácteos como alimento no es explotado completamente, éstos son utilizados principalmente por sus propiedades fisicoquímicas y su valor nutricional. Sin embargo, en muchos casos las propiedades fisiológicas especiales de muchas de sus proteínas menores son menospreciadas; la leche y los productos lácteos contienen factores protectivos (inmunoglobulinas, lactoferrina y enzimas), factores de crecimiento y hormonas, y un tercer grupo de nutraceúticos derivado de los lácteos, el cual es de importancia relevante, son los péptidos con propiedades biológicas que son liberados de las proteínas de la leche cuando estas son sujetas a proteólisis in vitro o in vivo (Fox, 2001).

3.1.1 Proteínas de la Leche

Las proteínas de leche se clasifican en Caseínas y Proteínas de Suero. Las proteínas de la leche son una fuente importante de aminoácidos esenciales y en adición al papel nutricional, tienen importancia fisiológica y son una fuente de péptidos biológicamente activos (Fiat y col., 1993). En la tabla 2 se reúnen las principales características de las proteínas de la leche.

Tabla 2. Concentración y Funciones Biológicas de las Principales Proteínas de la Leche

PROTEINA	CONCENTRACION (g/L)	FUNCION BIOLOGICA SUGERIDA
Caseínas (α,β κ)	28	Precursoras de péptidos bioactivos.
β-Lactoglobulina	3.3	Acarreadora de retinol, liga ácidos grasos y precursora de péptidos bioactivos.
α-Lactoalbumina	1.2	Síntesis de lactosa, acarreadora de Ca^{2+}, precursora de péptidos bioactivos.
Inmunoglobulinas	0.1-0.5	Protección inmunoespecifica.
IgGT	0.6	
IgG2	0.06	Sistemas de anticuerpos.
IgM	0.09	
IgA	0.08	
Glicomacropéptido	1.2	Agente antimicrobiano, antitrombótico y regulador de la función gástrica.
Lactoferrina	0.1	Acción antimicrobiana, transportadora de Hierro y precursora de péptidos bioactivos.
Lactoperoxidasa	0.03	Antimicrobiana con efecto sinérgico con las IG´s y la Lactoferrina.

Lisozima	0.0004	Acción antimicrobiana.
Seroalbúmina	0.3	Precursora de péptidos bioactivos y liga ácidos grasos.
Proteosa peptona	1.2	Acarreadora potencial de minerales.

(Syndayikengera and Wenshui, 2005)

3.1.1.1 Caseínas

Las caseínas comprenden el 78% del total de las proteínas de la leche; estas son proteínas fosfóriladas, que constituyen aproximadamente entre 85 y el 90% del total de la caseína (Santos, 1987). La leche contiene cuatro tipos de caseínas con propiedades sustancialmente diferentes: α_{S1}, α_{S2}, β y κ-caseína, en proporciones de aproximadamente el 38%, 10%, 36% y 12% (±4%) respectivamente. Las caseínas son proteínas bien caracterizadas (Fox, 2001), algunas de sus propiedades más importantes son:

- Masa molecular de 20-25 KDa.
- Están fosforiladas, mediante enlaces ester con serina o treonina
- Solo α_{S2} y κ- caseínas contienen cisteína, la cual se encuentra como puente disulfuro dentro de la molécula; mientras que la ausencia de cisteína en α_{S1} y β-caseínas incrementa la flexibilidad de éstas.
- Todas las caseínas presentan un alto contenido de Prolina, que evita la formación de una estructura secundaria; especialmente la β-caseína.
- Poseen un bajo nivel de estructura secundaria y terciaria por lo cual son muy flexibles e inestables.
- Presentan un centro hidrofóbico pero tienen una gran superficie hidrofílica.
- Exhiben polimorfismo genético, lo cual involucra la sustitución de uno o dos aminoácidos y raramente, la deleción de una secuencia de 12 residuos de aminoácidos.

3.1.1.2 Proteínas del Suero de la leche

Las proteínas del lactosuero incluyen al conjunto de sustancias nitrogenadas que no floculan cuando el pH de la leche se lleva a 4.6, por lo que también se les llama proteínas solubles; estas proteínas constituyen el 17% del total de las proteínas de la leche. Las principales proteínas que constituyen el lactosuero son:

- β-lactoglobulina: Es la proteína principal del lactosuero y constituye alrededor del 50% del total de las proteínas solubles. Tiene un peso molecular de 18.2 kDa y no contiene fósforo ni carbohidratos.

- α-lactoalbúmina: Constituye alrededor del 22% del total de las proteínas del lactosuero, se caracteriza por su bajo peso molecular de 14.2 kDa y por su alto contenido de triptofano. Interviene en la biosíntesis de lactosa y no contiene fósforo ni carbohidratos.

- Seroalbumina: Constituye el 5% del total de las proteínas solubles, tiene un peso molecular de 69 kDa y no contiene fósforo ni carbohidratos.

- Inmunoglobulinas: Son las moléculas más grandes que se encuentran en la leche, tiene un peso molecular de 160 kDa y no contiene fósforo pero si 2.9% de carbohidratos. Contiene un grupo prostético glicosídico y exhiben las propiedades inmunológicas de la gamma globulina.

- Proteosa-peptona: Contiene carbohidratos y hasta 6% de fósforo, se encuentran en el suero lácteo, en las micelas y en la película del granulo de grasa.

- Proteínas menores: En este grupo se incluyen algunas proteínas que son difíciles de clasificar. Entre ellas están las transferrinas o proteínas rojas, las lactolinas y las proteínas de la membrana del glóbulo de grasa. En conjunto, representan aproximadamente el 5% de las proteínas del lactosuero (Santos, 1987 y Alais, 2001).

Las proteínas del lactosuero sí contienen gran cantidad de cisteína y cantidades considerables de lisina, leucina, triptofano y ácidos glutámico y aspártico; por lo que se consideran como de alto valor nutricional. Se demostró la presencia de péptidos bioactivos en la α-lactoalbúmina, fragmento 50-53, presenta actividad opioide, y en la β-lactoglobulina se han localizado β-lactorfinas, que presentan actividad antihipertensiva y opioide (Jiménez y col., 2001).

3.2 Bacterias Ácido Lácticas

Las bacterias ácido lácticas constituyen un grupo heterogéneo de bacilos y cocos gram-positivos, aerotolerantes, desprovistas de citocromos, que se caracterizan por la formación de ácido láctico como producto final exclusivo o mayor de la fermentación de los azúcares (Holzapfel y col; 2001) (Tabla 3). Se encuentran en ambientes diversos, pueden ser flora normal del cuerpo humano (cavidad oral, tracto genital femenino, piel, etc.), algunas son responsables de la formación de la placa dentaria y la iniciación de las caries dentales. Son usadas en la producción de varios productos alimenticios tales como el yogurt, leches fermentadas, quesos, embutidos madurados, pepinos fermentados, chucrut y muchos productos locales. Las actividades de las bacterias lácticas sobre los alimentos incluyen (Kunji y col., 1996):

1. Fermentación y agotamiento de la lactosa de la leche
2. Reducción del potencial redox
3. Fermentación de citrato
4. Degradación de caseína y otras proteínas
5. Degradación de lípidos

Tabla 3. Géneros de las Bacterias Ácido Lácticas

Carnobacterium	*Oenococcus*
Enterococcus	*Pediococcus*
Lactococcus	*Streptococcus*
Lactobacillus	*Tetragenococcus*
Lactosphaera	*Vagococcus*
Leuconostoc	*Weisella*

Estas bacterias se emplean en la manufactura de varios alimentos fermentados, bebidas y productos alimenticios. Indudablemente la aplicación más importante de las bacterias ácido lácticas es como cultivos iniciadores en la manufactura de productos fermentados; en particular *Streptococcus thermophilus, Lactococcus lactis, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus* ((Jay, 2000, Savijoki, 2006).

Las bacterias ácido lácticas se caracterizan por su alta demanda de factores de crecimiento esenciales tales como péptidos y aminoácidos; sin embargo, la leche no contiene suficientes aminoácidos libres ni péptidos para que puedan desarrollarse. Por lo tanto, dependen de un sistema proteolítico para degradar las proteínas de la leche y poder desarrollarse en ella (Shihata y col., 2000).

El sistema proteolítico, que digiere principalmente a las caseínas, además de proveer de aminoácidos esenciales a las células, también tiene un gran interés industrial, debido a que contribuye al desarrollo de propiedades organolépticas de los productos fermentados. El sistema proteolítico más estudiado es el de

Lactococcus lactis, y se ha tomado como modelo para la proteólisis de las caseínas, peptidólisis y transporte (Savijoki, 2006).

3.2.1 Sistema Proteolítico de las Bacterias Ácido Lácticas

Los componentes estructurales del sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas (Fig. 1) puede ser dividido en tres grupos con base en su función:

1. Proteinasas, rompen a las caseínas en péptidos.
2. Sistema de transporte, transporta a los productos a través de la membrana citoplasmática.
3. Peptidasas, degradan a los péptidos.

3.2.1.1 Proteinasas

La proteinasa madura es una serin-proteasa monómerica de aproximadamente 2000 residuos con un peso molecular entre 180 y 190 KDa; se localiza en la pared celular de las bacterias ácido lácticas. Con base en el patrón de degradación de las caseínas α_{s1}, β y κ, se han descrito en *Lactococci* dos clases de proteinasa (PrtP); si es una proteinasa de tipo P_I hidroliza en mayor extensión a la β-caseína que a la κ-caseína; mientras que si es una proteinasa de tipo P_{III} degrada α_{s1}, β y κ-caseína por igual (Kunji y col., 1996).

Proteinasas de diferentes bacterias ácido lácticas han sido caracterizadas; entre éstas se encuentran la PrtP de *Lactococcus lactis y Lactobacillus paracasei*, PrtH de *Lactobacillus helveticus*, PrtR de *Lactobacillus rhamnosus*, PrtS de *Streptococcus thermophilus* y PrtB de *Lactobacillus bulgaricus*. Cabe mencionar que las bacterias ácido lácticas típicamente poseen sólo una proteinasa, sin embargo, en *Lactobacillus helveticus y Lactobacillus bulgaricus* se reportó la presencia de dos proteinasas (Savijoki, 2006).

Estudios indican que solo una parte de la β-caseína es degradada por las proteinasas formando fragmentos relativamente grandes, es dividida en más de

100 diferentes oligopéptidos, los cuales se encuentran en un rango de entre 4 y 30 residuos de aminoácidos (Savijoki, 2006). La degradación de la κ-caseína produce un gran número de oligopéptidos pequeños, los cuales probablemente se originan de la región 96-106 y de la parte del extremo C-terminal. Por otra parte, la degradación de la caseína α_{s1} y α_{s2} es realizada por la proteinasa tipo P_{III}; se han identificado cerca de 25 oligopéptidos derivados la caseína α_{s1} por diversas proteinasas (Kunji y col., 1996).

3.2.1.2 Sistema de Transporte de Aminoácidos y Péptidos

Varios sistemas de transporte de aminoácidos son activos y utilizan la hidrólisis de ATP como fuente de energía. En general, los sistemas de transporte de aminoácidos pueden ser manejados por una fuerza motriz de protones o por un sistema de concentración de gradientes de ambos solutos (Kunji y col., 1996).

El sistema de transporte de oligopéptidos más estudiado es el Opp (Fig. 2) en *Lactococcus lactis*. Las proteínas Opp pertenecen a una familia altamente conservada de transportadores unidos a ATP, que regulan el consumo de los péptidos derivados de las caseínas, los genes de estas proteínas se encuentran en un solo operón; la OppA es la proteína encargada de unirse a los oligopéptidos, OppB y OppC son proteínas integrales de membrana y OppD y OppF son las proteínas fijadoras de nucleótidos (Savijoki, 2006)

El sistema Opp de otras bacterias ácido lácticas no ha sido estudiado ampliamente pero se ha reportado que, en *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, la composición del sistema Opp es similar al descrito para *Lactococcus* (Kunji y col., 1996, Savijoki, 2006).

Otros sistemas de transporte de péptidos identificados en *Lactococcus*, incluyen el que utiliza fuerza protón motriz para di y tripéptidos, llamado Sistema DtpT; y el sistema DtpP manejado por ATP (Fig. 1), el cual es capaz de transportar di, tri y tetrapéptidos que contienen aminoácidos con cadenas laterales relativamente hidrofóbicas (Savijoki, 2006).

3.2.1.3 Peptidasas

La aminopeptidasa N (PepN) es una metalopeptidasa monomérica de aproximadamente 95 KDa capaz de escindir aminoácidos del extremo N-terminal de un vasto rango de péptidos, tanto en tamaño como en composición. Se ha investigado la especificidad de la enzima por di y tripéptidos, aunque la actividad de PepN es también hacia oligopéptidos. La aminopeptidasa C (PepC) es una Tiol-peptidasa de 50 KDa que, en todos los organismos estudiados hasta la fecha, presenta actividades similares a PepN.

La Tripeptidasa (PepT) es una metaloenzima homodimérica de aproximadamente 105 KDa, la especificidad de PepT es estrictamente limitada a tripeptidos; PepT fue encontrada por hidrolizar tripeptidos con prolina en la primer y tercer posición, pero es incapaz de dividir tripeptidos que tengan prolina en la segunda posición (Kunji y col., 1996).

La dipeptidasa es una metalopeptidasa monomérica de 51KDa; se ha observado algunas preferencias hacia residuos hidrofóbicos en el extremo N-terminal mientras la especificidad hacia dipéptidos que contienen Pro, Glu, o Asp es ausente o muy baja.

También existen varias peptidasas especializadas en hidrolizar secuencias que contengan prolina, son importantes para la degradación de péptidos derivados de caseína (por su alto contenido de prolina). Las peptidasas generales como son PepN, PepC y PepT son las primeras en actuar en los oligopéptidos, y también son capaces de dividir tripéptidos y oligopéptidos que contiene prolina, *in vitro,* aunque las actividades observadas usualmente son bajas (Savijoki, 2006).

Por otra parte, estudios sugieren que la localización de algunas peptidasas es la pared celular, pero datos bioquímicos, genéticos e inmunológicos, sugieren una localización intracelular de la mayoría, sino de todas, las estudiadas hasta la fecha (Kunji y col., 1996).

Otras peptidasas más específicas son: PepA, que libera residuos acidicos del extremo amino terminal de péptidos con 3 a 9 residuos de aminoácidos; PepP,

prefiere tripéptidos que contienen prolina en la posición intermedia; PepR y PepI, actúan en dipéptidos que contienen prolina en la penúltima posición; PepQ, divide dipéptidos que contiene prolina en la segunda posición y PepS, muestra preferencia por péptidos que contiene dos o cinco residuos de arginina o residuos de aminoácidos aromáticos en la posición amino terminal (Savijoki, 2006).

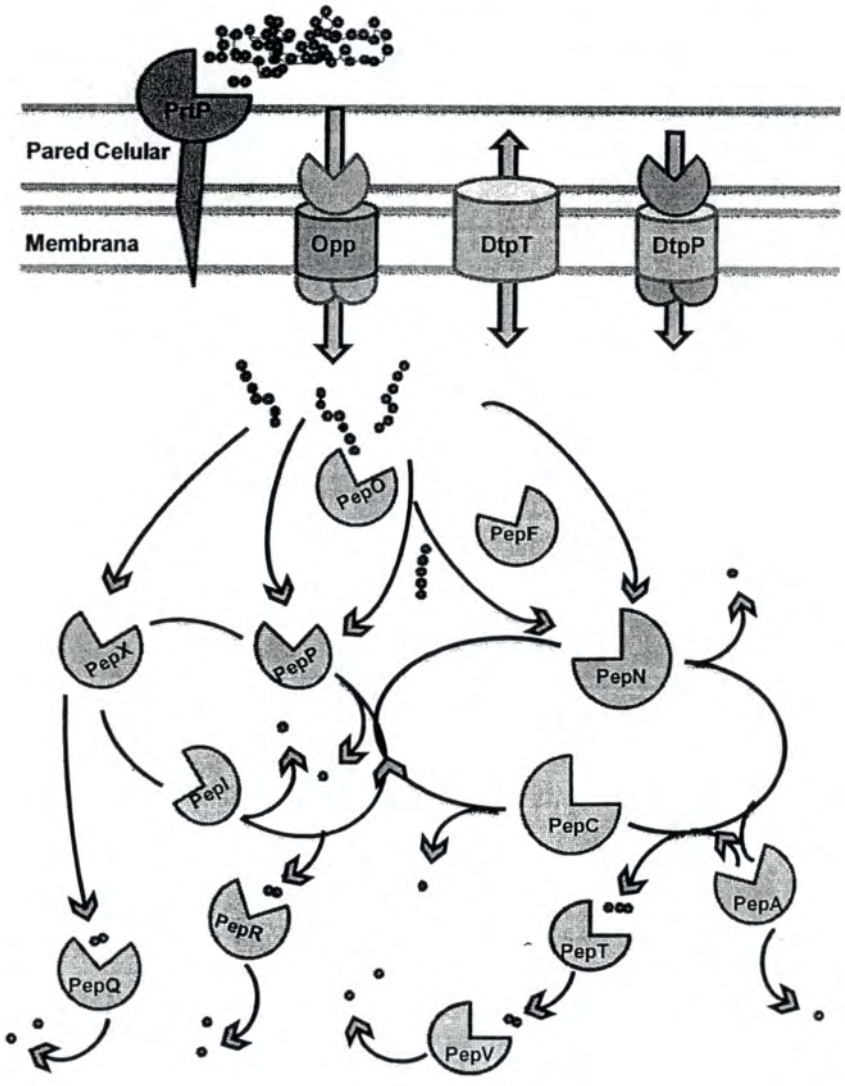


Figura 1. Modelo propuesto del sistema proteolítico de *Lactococcus lactis*, donde la proteinasa (PrtP) rompe la caseína en péptidos,los sistemas de transporte (Opp para oligopéptidos, DtpT para di y tripéptidos y DtpP para di tri y tetrapéptidos) para los péptidos a través de la membrana citoplasmática y las péptidasas [especificas a prolina (PepX, PepI, PepP, PepQ, PepR), generales (PepO, PepF, PepC, PepN, PepT, PepV) y especifica para ácido glutámico (PepA)] que degradan a los péptidos.

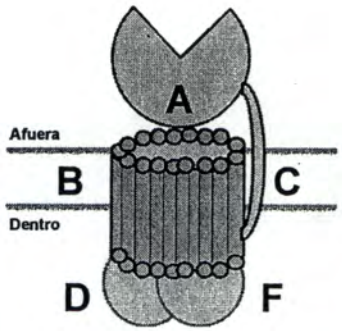


Figura 2. Sistema de Transporte de Oligopéptidos Opp. En donde OppA es la proteína encargada de unirse a los oligopéptidos, OppB y OppC son proteínas integrales de membrana y OppD y OppF son las proteínas fijadoras de nucleótidos

3.2.1.4 Regulación del Sistema Proteolítico

Se había sugerido que los di y tripéptidos con residuos hidrofobicos actuaban como moléculas efectoras en la regulación transcripcional del sistema Opp y por eso impactaban en todo el sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* (Kunji y col. 1996). Sin embargo, en estudios recientes se observó que seis unidades transcripcionales muestran represión cuando se les adiciona hidrolizados de caseína con 80% de péptidos y 20% de aminoácidos en el medio de cultivo y la expresión fue solo cuando las células encontraban condiciones limitantes de nitrógeno(Savijoki, 2006).

El regulador transcripcional CodY regula negativamente la expresión de varios componentes de el sistema proteolítico en *Lactococcus lactis*, y la fuerza de represión es modulada por los aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) incluyendo Isoleucina, Leucina y Valina (Guédon y col. 2001; Petranovic y col. 2004).

CodY regula su propia síntesis y requiere de isoleucina, leucina o valina para unirse a la caja de CodY presente en el promotor en *Lactococcus lactis*. En resumen, el sistema proteolítico es reprimido por CodY y la expresión es llevada a cabo cuando las células encuentran cantidades limitantes de BCAAs (Guédon y col. 2001). Por otra parte el mecanismo regulatorio del sistema proteolítico en *Lactobacilli* ha sido menos estudiado, la concentración de péptidos en el medio

mostró controlar la biosíntesis de PrtH y PrtR en *Lactobacillus helveticus* y en *Lactobacillus rhamnosus* respectivamente (Hebert y col. 2000).

La PrtH de *Lactobacillus helveticus*, fue reprimida en un medio rico en péptidos, en el que dipéptidos compuestos de leucina y prolina jugaron un papel importante en la regulación de la actividad de PrtH . A la fecha, solo se ha identificado una proteína reguladora que controla directamente la expresión de genes pertenecientes al sistema proteolítico (Savijoki, 2006).

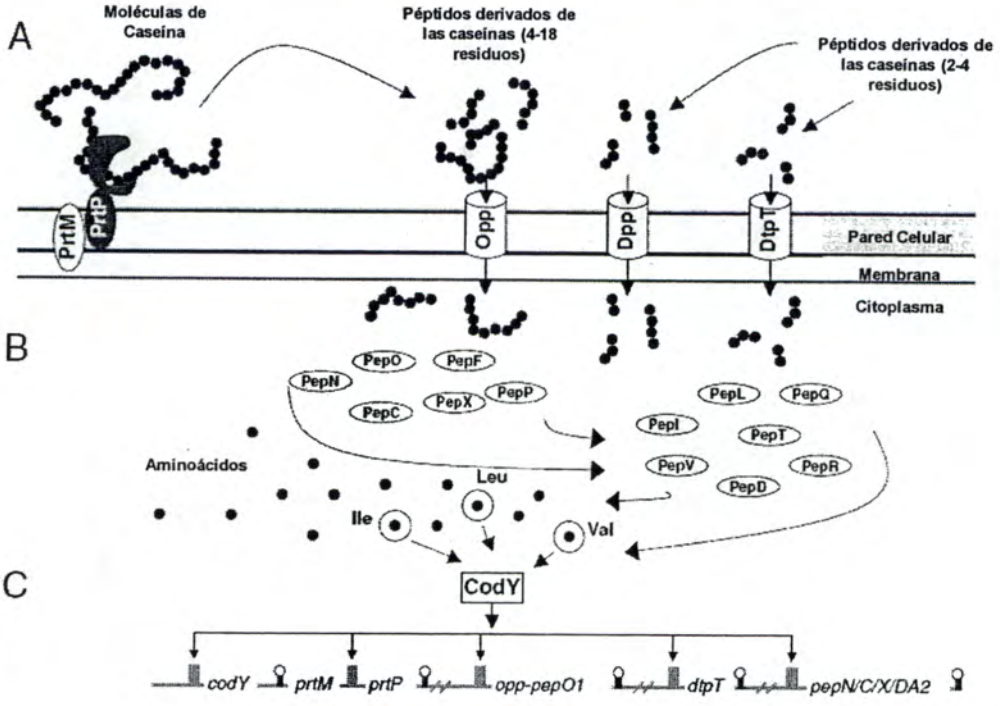


Figura 3. Regulación del Sistema Proteolítico de *Lactococcus* A) Proteinasa (PrtP), sistemas de transporte (Opp, DtpT, DtpP y Dpp) para los productos a través de la membrana citoplasmática, B) Peptidasas intracelulares(PepN, PepO, PepF, PepC, PepX, PepP, PepI, PepV, PepL, PepT, PepQ, PepR, PepD) y C) El represor transcripcional CodY el cual utiliza como cofactores a los aminoácidos isoleucina, leucina y valina para reprimir la expresión de los genes del sistema proteolítico en *L.lactis*.

3.3 Bacterias Probióticas

Una asociación benéfica de bacterias con el huésped fue sugerida probablemente primero por Döderlein (1892); posteriormente Metchnikoff, (1908) postuló una asociación del efecto benéfico con productos lácteos fermentados.

Así, originalmente un probiótico fue definido como un microorganismo que promueve o aporta un balance benéfico en la microflora microbiana nativa del tracto gastrointestinal cuando éste es consumido en cantidades adecuadas (Holzapfel, 2001).

Casi todos los microorganismos considerados como probióticos son productores de ácido láctico tales como *lactobacilli y bifidobacteria*; y deben cumplir con ciertas características como:

- Ejercer un efecto benéfico en el huésped.
- Ser no patógeno y no toxico.
- La fuente debe contener un gran número de células viables.
- Ser tolerantes a los ácidos y bilis.
- Ser capaces de adherirse al epitelio intestinal del huésped.
- Ser capaces de sobrevivir y metabolizar en el intestino.
- Permanecer viables durante el almacenamiento y consumo.
- Deben tener actividad antagónica contra bacterias patógenas.

(Collins, 1999, Soomro, 2002, Wen-Hsin y col; 2006)

Por otra parte, de acuerdo con varios autores los efectos positivos sobre la salud asociados con el consumo de probióticos son:

- Alivio de síntomas en personas intolerantes a la lactosa.
- Aumento en la resistencia contra enfermedades infecciosas en el tracto intestinal.

- Disminución de la prevalencia de cáncer en poblaciones que los consumen.
- Reducción de colesterol en sangre.
- Mejoramiento de la digestión.
- Estimulación de inmunidad intestinal.

(Collins, 1999 y Sanders, 2000).

Actualmente, las investigaciones se han enfocado en la búsqueda de evidencia de la disminución de la prevalencia de diferentes tipos de cáncer especialmente cáncer de colon debido al consumo frecuente de probióticos (Sanders, 2000).

El factor limitante para poder observar el efecto probiótico sobre el huésped es la cantidad de bacterias ingeridas. Se sugiere que el consumo mínimo de estos microorganismos sea de 10^6 UFC/g de producto (Shah, 2000).

Este contenido de microorganismos probióticos se ha observado en yogurt fresco ya que la Norma de la Federación Internacional de Lácteos establece que el yogurt debe contener alrededor de 10^7 UFC/g (Jay, 2000).

A pesar de que los probióticos podrían ofrecer muchos beneficios en la salud, muchos factores afectan la composición de la microflora intestinal en humanos: edad, susceptibilidad a infecciones, requerimientos nutricionales el estatus inmunológico del huésped y el pH, tiempo de transito intestinal, interacciones entre los componentes de la flora, presencia y disponibilidad de material fermentable en el intestino y, sobre todo, aspectos genéticos y el estilo de vida de cada individuo (Collins, 1999).

Otra estrategia que se ha comenzado a estudiar para coadyuvar en el mejoramiento de la calidad de vida y la salud por medio de la modificación de la microflora, sobre todo la intestinal, es el uso de simbióticos. En éstos los probióticos y los prebióticos son usados en combinación. Esta combinación,

normalmente hace que la sobrevivencia de los microorganismos probióticos aumente. Esto se logra incrementando la disponibilidad y especificidad de sustrato disponible para fermentar, con lo que se incrementa la colonización del tracto gastrointestinal (Collins,,1999).

3.3.1 Lactobacillus

Entre las bacterias ácido lácticas, los miembros del genero *Lactobacillus* presentan requerimientos nutricionales complejos que pueden ser satisfechos por un medio de cultivo que contenga fuentes de energía, precursores para crecimiento y división celular y sustancias estimuladoras de crecimiento. (Elli y col., 1999).

Los requerimientos para el crecimiento de *Lactobacilli* son: una temperatura de 4-50°C, abundantes nutrientes y baja concentración de oxígeno. Estudios de crecimiento en *L. johnsonii*, demostraron la importancia de cuatro aminoácidos, L-cisteina, DL-alanina, DL-serina y DL-isoleucina; de los cuales el más importante es la L-cisteina, ya que se confirmó que su ausencia afecta negativamente su crecimiento (Elli y col., 1999).

Lactobacillus casei pertenece al subgénero *Streptobacterium*, es homofermentativo y puede crecer a 15 °C, el contenido de G+C es de 45 a 47% y produce ácido láctico. *L. casei* sobrevive a pH ≥ 2.7, mientras que el número de células viables decrece rápidamente a pH 2.5. En jugo intestinal el organismo prolifera lentamente, pero el crecimiento decrece conforme la concentración de bilis aumenta. *L.casei Shirota* muestra resistencia espontánea a 12 agentes antibacteriales, curiosamente, los más usados en tratamiento clínico (Yakult Central Institute, 1999).

Para favorecer un máximo de crecimiento de *L.casei Shirota* en un medio de cultivo sintético son absolutamente requeridos 12 aminoácidos, 4 vitaminas y bases nitrogenadas. *L.casei Shirota* es auxotrofico para valina, ácido glutamico, ácido nicotínico y ácido pantoténico, los que comúnmente se requieren para el crecimiento de la mayoría de las especies de bacterias ácido lácticas (Yakult Central Institute, 1999).

El consumo de *Lactobacilli*, como *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*, tienen el potencial de ayudar a la digestión de la lactosa, a controlar los niveles de colesterol, a controlar las infecciones gastrointestinales y ejercer actividad contra tumores; pero para la mayoría de estos beneficios, es necesario consumir una concentración adecuada de células viables de *L. acidophilus* o *L. casei*. *Lactobacillus casei Shirota*, activa la respuesta inmune celular e inhibe la incidencia de tumores y la producción de IgE, la cual regula la reacción alérgica y protege contra influenza (Hosono, 2002).

Estudios de células viables de Lactobacillus durante el almacenamiento fueron realizados; encontrando que *L. acidophilus* tiene mayor estabilidad durante el almacenamiento en refrigeración si es adicionado al producto lácteo como cultivo iniciador permitiéndole así crecer durante el proceso de fermentación, ya que al adicionarlo después de la fermentación éste muere rápidamente. Así mismo, *L. casei* y otras especies de *Lactobacilli* en adición a *L. acidophilus*, pueden usarse como suplementos bacterianos en productos lácteos fermentados porque su estabilidad durante el almacenamiento fue igual o mayor que la de las especies de *L. acidophilus* probadas (Nighswonger y col. 1996).

La actividad proteolítica es muy importante, la mayor actividad es la de *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus*, seguido por *Lactobacillus casei*; mientras que *Streptococcus thermophilus* es débilmente proteolítico comparado con *Lactobacillus lactis subs. Cremoris*. Por lo tanto el género *Lactobacilli* presenta una actividad proteolítica de 61-144.6µg de tirosina/mL de leche, comparado con *S. thermophilus que presenta* 2.4-14.8µg de tirosina/mL de leche, sin embargo, estos microorganismos en un cultivo mixto son mucho más proteolíticos (92.6-419.9µg de tirosina/mL de leche) (Rajagopal y Sandine, 1990). En un cultivo mixto, el yogurt, las enzimas proteolíticas de *L. bulgaricus* degradan las caseínas liberando péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos; que fueron estimulantes de crecimiento para *S. thermophilus*; dando así una relación sinérgica bien documentada (Rajagopal y Sandine, 1990).

3.3.2 Streptococcus

La concentración de ciertos aminoácidos, como el ácido glutámico y metionina en la leche están lejos de cumplir con los requerimientos necesarios para que *S. thermophilus* pueda crecer; ya que requiere de al menos 200 y 60mg por litro respectivamente de cada uno de los aminoácidos. Por lo tanto, se ve obligada a encontrar una fuente complementaria de aminoácidos para poder crecer en leche.

Así, la presencia de una proteinasa en la pared celular (PrtS), un sistema de transporte de oligopéptidos, (Ami) y un gran juego de peptidasas celulares permiten a *S. thermophilus* usar las proteínas de la leche de manera similar a la descrita para *Lactococci* (Letort, 2002).

Su crecimiento presenta dos fases exponenciales separadas por una fase no exponencial, a esto se le llama crecimiento diauxico, característico entre las especies Prt+ de *Streptococcus*. Letort (2002) observó que en la primera fase exponencial *Streptococcus* no produce PrtS, esto se debe a que *Streptococcus* utiliza los aminoácidos libres como fuente de nitrógeno. En la segunda fase exponencial se observa una reducción en la velocidad de crecimiento a pesar de la síntesis de PrtS, lo que sugiere que el proceso de utilización de caseína limita su crecimiento.

Se ha observado que la utilización de caseína por *S. thermophilus* y su crecimiento en leche presenta similitudes con la de *Lactococcus lactis*:

- Primero, la utilización de la caseína durante el crecimiento resultó de una ruta similar, involucrando dos actividades cruciales: la proteólisis y el transporte de oligopéptidos.

- Segundo, la velocidad de crecimiento de ambos microorganismos es limitado por el proceso de utilización de caseína. Sin embargo, el paso de la ruta proteolítica responsable de la limitación del crecimiento no es la misma; para *L. lactis*, se ve limitado por el rango de proteolisis por la PrtP;

mientras que para *S. thermophilus*, su crecimiento está limitado por la velocidad de transporte de los productos de la proteolisis (Letort, 2002).

Por otra parte Garault y col. (2000) identificaron por primera vez la ruta de biosíntesis para aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) como una ruta clave para el óptimo crecimiento de *Streptococcus thermophilus* en leche. Esta ruta, en la que a partir de piruvato se sintetiza leucina, valina e isoleucina, se encuentra bajo un control complejo incluyendo procesos de retroinhibición (por producto final) y regulación a nivel trascripción. Así mismo demostró que esta ruta es necesaria pero insuficiente para un crecimiento óptimo de *S. thermophilus*.

3.4 Leches Fermentadas

Existe una amplia variedad de leches fermentadas en las que interviene un gran número de especies bacterianas lácticas y algunas levaduras (Tabla 4). En algunos países el consumo de estos productos es superior al de la leche fresca, y se utilizan leches de diferentes especies. Es difícil definir estos productos debido a su gran número ya que se elaboran de diferentes formas y con distintos tipos de materia prima; también es difícil el intentar una clasificación ya que sus características pueden variar; los microorganismos que intervienen en su elaboración también, de acuerdo con la región, el procedimiento de inoculación y aún de las condiciones climáticas (García y col., 1993).

La mayoría de las leches fermentadas son el resultado del metabolismo de las bacterias ácido lácticas que crecen en la leche; su excelente calidad nutricional se puede atribuir principalmente a la leche, que ofrece una fuente importante de calcio, proteínas, fósforo y riboflavina; los beneficios adicionales sobre la salud se deben al proceso de fermentación, que resulta en productos con un gran número de microorganismos y sub-productos de fermentación.

Tabla 4. Clasificación de las leches fermentadas de acuerdo con el tipo de su flora dominante

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

(García, 1993).

Las actividades proteolíticas de las bacterias ácido lácticas (bacterias del yogurt y bacterias Probióticas) y las enzimas proteolíticas en conjunto con la leche son una fuente importante de péptidos (Shihata y col., 2000).

Los péptidos bioactivos se encuentran en la leche, en leches fermentadas, quesos y sueros derivados de quesería. Son producidos por las enzimas proteolíticas de la leche, las que provienen de las bacterias ácido lácticas y las que provienen de fuentes exógenas (Torres y col., 2005).

3.5 Péptidos Bioactivos

El término bioactividad se refiere a la actividad que los alimentos o productos de su digestión tengan, afectando los procesos biológicos teniendo un impacto sobre la función del cuerpo y, últimamente, sobre la salud (Gerdes y col., 2001). Así mismo, el término biogénico, se refiere a componentes derivados de los alimentos a través de la actividad microbiana y que benefician a la salud sin involucrar microflora intestinal. Los biogénicos más importantes en las leches fermentadas pueden ser los péptidos que no están presentes antes de la fermentación (Takano, 2002).

Un péptido bioactivo es una secuencia de aminoácidos de 2 y 15 aminoácidos, inactivo dentro de la proteína intacta pero que puede activarse al ser liberado durante la digestión del alimento en el organismo del individuo o por un procesado del alimento. Las funciones biológicas de los péptidos se pueden ejercer siempre y cuando los péptidos logren atravesar el epitelio intestinal para entrar a la circulación sanguínea o se unan a receptores específicos de las células epiteliales para emitir señales celulares con un impacto fisiológico. De todas las proteínas presentes en la leche, la caseína parece ser la mayor fuente de este tipo de péptidos. (Vioque y Millán, 2005). En particular, los hidrolizados de proteínas de leche tienen propiedades activas fisiológicas que pueden influir, por ejemplo, en la regulación del sistema inmune, presión sanguínea, trasporte de minerales o coagulación de la sangre (Rokka y col., 1997).

3.5.1 Péptidos Opioides

Los péptidos opioides son fragmentos de β-caseína llamados β-casomorfinas, debido a su origen exógeno y a sus propiedades similares a la morfina; sin embargo, estos también pueden ser obtenidos de la hidrólisis de las fracciones de caseína α_{s1} (Clare y Swaisgood, 2000).

La mayoría de las β-casomorfinas son fragmentos de las secuencia 60-70 de la β-caseína (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn-Ser-Leu) y son caracterizados como ligando tipo μ (Meisel y col., 2000). Los receptores opioides (tipo μ, κ y δ) están localizados en el sistema nervioso, en el sistema endocrino y en el inmune así como en el tracto intestinal de los mamíferos y pueden interactuar tanto con sus ligandos endógenos como con opioides exógenos y opioides antagonistas (Meisel, 1997).

Entre estos, las β-endorfinas, han mostrado ejercer actividad inmunomodulatoria in vivo e in vitro por mejorar la respuesta de proliferación de los linfocitos (Gill y col., 2000).

Las casomorfinas, como opioides ligandos, modulan el comportamiento social, incrementan el comportamiento analgésico prolongan el tiempo de transito gastrointestinal por inhibición de la peristalsis intestinal y la motilidad, ejercen

acción antisecretoria (antidiarrea), modulan el trasporte de aminoácidos y estimulan la respuesta endocrina, como la secreción de insulina y somatostatina. Probablemente los péptidos opioides de leche jueguen un papel regulatorio del apetito por modificación de la actividad endocrina del páncreas, resultando en un incremento de producción de insulina.

Las β-casomorfinas son resistentes a enzimas del tracto gastrointestinal; el transporte pasivo de β-caseinomorfinas a través de la mucosa intestinal ocurre en neonatos, lo que puede tener un efecto analgésico en el sistema nervioso resultando en la calma y sueño de los infantes. En mujeres lactando o embarazadas la β-casomorfina originada en la leche pasa a través del tejido mamario, y posiblemente influencia la liberación de prolactina y oxitocina (Clare y Swaisgood, 2000).

Los péptidos antagonistas suprimen la actividad agonista; Yoshikawa (1986), reportó que un extracto con cloroformo y metanol de una digestión de caseína κ se une al receptor opioide al cerebro de ratas, el péptido se metiló en el extremo carbonilo terminal y su efecto cambió a antagonista en los receptores opioides tipo μ y κ; este péptido fue llamado casoxina.

Los péptidos opioides típicos son conocidos como endógenos, derivados de encefalinas, endorfinas y dinorfinas. Sus efectos fisiológicos dependen del tipo de receptor: los receptores μ están vinculados con el control de la motilidad intestinal y comportamiento emocional, los receptores δ, con el control del comportamiento emocional y los receptores κ están relacionados con analgesia y saciedad. Los péptidos opioides atípicos derivados de las proteínas de la leche, pueden presentar actividad agonista o antagonista. Los derivados de las caseínas, son conocidos como casomorfinas y/o casoxinas, mientras que los derivados de las proteínas séricas, son conocidos como lactorfinas (Torres y col., 2005).

3.5.1.1 Características generales

Las características generales de los péptidos opioides endógenos y exógenos es la presencia de un residuo de tirosina en el amino terminal y la

presencia de otro residuo aromático, por ejemplo, fenilalanina o tirosina en la tercera o cuarta posición, además de un residuo de prolina en la segunda posición. Esta estructura es importante porque es el sitio de unión a los receptores opioides. El potencial negativo, localizado en la vecindad del grupo fenólico de la tirosina, parece ser esencial para la actividad opioide. El residuo de prolina en la segunda posición es crucial para la actividad biológica de los péptidos opioides porque mantiene la orientación de la cadena lateral de tirosina y fenilalanina (Meisel y col., 2000, Hartmann y Meisel, 2007).

3.5.2 Péptidos Inmunomoduladores

La bioactividad de inmunopéptidos fue caracterizada por diferentes sistemas de prueba in vitro e in vivo. Los inmunopéptidos derivados de caseína incluyen fragmentos de α_{S1} y β caseínas que estimulan la fagocitosis de células rojas de eritrocitos por macrófagos del peritoneo y ejercen un efecto protector contra la infección de *Klebsiella pneumoniae* en ratones después de la administración intravenosa de péptidos (Meisel, 1997). Los péptidos inmunomoduladores además de tener la capacidad de mejorar la fagocitosis también modulan la proliferación y diferenciación de linfocitos (Schanbacher y col., 1997).

3.5.2.1 Péptidos inmunomoduladores derivados de Caseína α_{S1}

Los hidrolizados ricos en péptidos de caseína α_{S1}, modulan la función inmune de diferentes maneras debido a las distintas digestiones enzimáticas posibles. Tratamiento con tripsina libera al hexapéptido Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Tyr, que corresponde al fragmento 194-199 de la caseína α_{S1}, que promueve la formación de anticuerpos; también reduce la infección por *Klebsiella pneumoniae* en ratones in vivo por administración. La digestión con quimosina resulta en la producción de isracidina, que protege a ratones contra la infección de *Staphylococcus aureus* cuando el péptido les fue administrado intramuscularmente previo a la infección; también protege a vacas y ovejas contra la mastitis al administrarse directamente intraubre (Gill y col., 2000).

3.5.2.2 Péptidos inmunomoduladores derivados de Caseína β

La secuencia 193-209 de la caseína β (obtenida de la digestión de ésta con pepsina/quimosina) muestra estimulación de la proliferación de linfocitos de rata en cultivo in vitro en la ausencia de mitogenos o antigeno. La hidrólisis de la caseína β resulta en el hexapéptido Pro-GLy-Pro-Ile-Pro-Asn (residuos 63-68) y del tripéptido Leu-Leu-Tyr (residuos 191-193). Ambos péptidos promueven la formación de anticuerpos y aceleran la fagocitosis por murina peritoneal en macrofagos in vitro y también mejoran la resistencia de ratones a *K. pneumoniae* Las β-casomorfinas, modulan el sistema inmune, mejoran la resistencia de ratones a *Klebsiella pneumoniae*.(Gill y col., 2000).

3.5.2.3 Péptidos inmunomoduladores derivados de Caseína K

Péptidos derivados de la hidrólisis de caseína K mejoran la proliferación de linfocitos humanos, además el péptido Phe-Phe-Ser-Asp-Lys promueve la formación de anticuerpos y acelera la actividad fagocitica de murina y del macrofago humano in vitro (Jolles y col. 1988).

3.5.3 Péptidos Transportadores de Minerales

La hidrólisis proteolítica de caseína bovina por extractos pancreáticos, resulta en su degradación completa y en la liberación de componentes fosfóricos inorgánicos solubles. El fósforo orgánico derivado de la hidrólisis de caseína está asociado con nitrógeno y forma sales insolubles con varios metales; este componente es conocido como fosfopeptona. Los fosfopéptidos derivados de caseína, o caseinofosfopéptidos (CPP), son eficaces en incrementar la calcificación de huesos, independiente de la vitamina D (Kitts y Yuan, 1992).

Los fosfopéptidos de caseína pueden ser identificados después de ser liberados de α_{S1}, α_{S2} y caseína β, la mayoría de los fosfopéptidos de caseína contienen tres grupos de serina fosfato seguidos por dos residuos de ácido

glutámico; forman sales organofosfato solubles y probablemente funcionan como acarreadores de diferentes minerales, principalmente calcio.

Estas fracciones exhiben diferentes grados de fosforilación y una relación entre el grado de fosforilación con su habilidad de quelar minerales; así caseína α_{S2} > caseína α_{S1} > caseína β > caseína κ; sin embargo, la distribución de sus grupos de fosfoserina no es uniforme

Los fosfopéptidos de caseína son más resistentes a la hidrólisis enzimática en el intestino y son encontrados más frecuentemente como complejo con fosfato de calcio. La formación de este complejo resulta en un incremento en la solubilidad que provee una mejor absorción de calcio a través del intestino delgado distal en animales alimentados con dietas de caseína comparada con la absorción de animales control alimentados con dietas basadas en soya.

Este sistema de transporte pasivo es el medio primario de absorción de calcio bajo condiciones fisiológicas y provee de calcio a los huesos para la calcificación. Los fosfopéptidos de caseína también inhiben las lesiones por caries a través de la recalcificación del esmalte dental, por lo tanto, se ha propuesto su aplicación en el tratamiento de enfermedades dentales (Clare y Swaisgood, 2000).

Por otra parte, el fosfopéptido 59-79 de la caseína αs_1 tiene influencia en la respuesta proliferativa y producción de inmunoglobulina en cultivos de linfocitos, la actividad modulatoria de éste péptido fue atribuida a su región rica en fosfoserina, por otra parte el sitio inmunomodulatorio de los caseinofosfopéptidos, es una secuencia tripeptídica que contiene dos residuos de fosfoserina tanto en la región amino como carbonilo terminal (Hosono, 2002).

3.5.4 Péptidos Antitrombóticos

La trombosis es la formación o presencia de un coagulo de sangre dentro del torrente sanguíneo, el cual representa un factor de riesgo dentro de las enfermedades cardiovasculares (Gerdes y col., 2001).

El fibrinógeno es una proteína de plasma que es producida en el hígado y que es convertida a fibrina durante la formación de coágulos de sangre, la fijación de fibrinógeno por las plaquetas es necesaria para su agregación. Los péptidos antitrombóticos inhiben esta fijación de plaquetas (Gerdes y col., 2001).

Las casoplatelinas son péptidos derivados del extremo C-terminal de la caseína κ, son inhibidoras de la agregación de plaquetas activadas por ADP así como de la unión de la cadena γ del fibrinógeno humano a receptores específicos de la plaqueta. Existen péptidos antitrombóticos derivados de la caseína κ y todos se encuentran en la secuencia del residuo 106 al 116 y de fragmentos pequeños. (Meisel, 1997)

El fibrinógeno tiene un papel bifuncional, participa tanto en la agregación de plaquetas como en la formación de fibrina. En la agregación de plaquetas se han identificado dos sitios de unión en la molécula del fibrinógeno: la secuencia carboxilo terminal de la cadena γ del fibrinógeno (HHLGGAKQAGDV), que es relativamente específica y una secuencia de tetrapéptido (RGD[S o F], residuos 572-575 o 95-98 de la cadena γ del fibrinógeno). Los RGDS inhiben la unión del fibrinógeno y la agregación de plaquetas. El KRDS es un péptido con secuencia correspondiente a los residuos 39-42 de lactotransferrina humana, éstos inhiben la agregación de plaquetas inducida por ADP (Fiat y col., 1993).

3.5.5 Péptidos Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ACE)

Aunque durante los últimos años se ha visto un progreso en la detección y tratamiento de la hipertensión, ésta sigue siendo un problema importante en la salud pública, afectando a un billón de personas alrededor del mundo. Esta enfermedad se asocia con un incremento en la mortalidad, enfermedades coronarias del corazón, fallas en el corazón y falla renal. La incidencia de la hipertensión puede disminuir al controlar los factores de riesgo que provocan su desarrollo como: obesidad, alto consumo de grasa y sodio, consumo bajo de potasio, inactividad física y el consumo de alcohol y cigarros.

Estudios han demostrado que la modificación del estilo de vida puede provocar una ligera disminución en la presión sistólica, provocando una reducción dramática en eventos cardiacos. Sin embargo, se requiere de la farmacoterapia para normalizar la presión sanguínea y así reducir riesgos cardiovasculares (muerte cardiovascular, infartos al miocardio y paros cardíacos), dar protección renal y reducir el riesgo de eventos cerebrovasculares (Israili y col. 2007).

A pesar de la disponibilidad de más de 75 agentes antihipertensivos, el control de la presión sanguínea en la población es inadecuado; por lo que en el futuro la terapia antihipertensiva debería ser dirigida hacia el mejoramiento en el control de la presión sanguínea en pacientes hipertensos empleando la combinación correcta de agentes antihipertensivos disponibles.

Los péptidos, que poseen actividad antihipertensiva descritos hasta ahora lo hacen por inhibición de la enzima convertidora de angiotensina. Esta enzima es clave en la regulación de la presión sanguínea al convertir la angiotensina I en angiotensina II que es un potente vaso constrictor y por otro lado al inactivar a la bradiquinina que es un potente vasodilatador. Se han descrito tres péptidos de caseína α_{S1} y dos de la caseína β que muestran esta actividad (Jiménez y col., 2001).

La angiotensina I se produce por la acción de la renina y su hidrólisis conduce a la liberación de la angiotensina II y del dipéptido Hys-Leu, la angiotensina II provoca el incremento de la presión arterial e induce la liberación de aldosterona, lo que induce la retención de iones sodio por el riñón, elevando el volumen de sangre, y de esta manera, un incremento en la presión sanguínea. Las sustancias inhibidoras de ACE fueron de esta manera propuestas para disminuir la presión sanguínea (Leclerc y col., 2002).

Los inhibidores de ACE fueron descubiertos primero en el veneno de la víbora brasileña cabeza de flecha (*Bothrops jararacá*) en 1965 por Ferreira (Zola y Horovitz, 1981), y desde entonces muchos inhibidores sintéticos de ACE tales como Captopril, Enalapril, Lisinopril y Ramipril han sido usados en el tratamiento clínico de la hipertensión así como de algunos problemas de corazón en

humanos. Sin embargo, los inhibidores sintéticos de ACE pueden tener efectos secundarios incluyendo: tos, perdida del gusto, hipotensión, incremento en los niveles de potasio, reducción en la función renal, angioedema, salpullido en la piel, etc; es por eso que, para la prevención y tratamiento de esta enfermedad, se han hecho muchos esfuerzos para diseñar nuevos fármacos con menos efectos secundarios y descubrir y producir alimentos con actividad antihipertensiva, a pesar de requerirse dosis mucho más altas que de los medicamentos antihipertensivos (López-Fandiño y col., 2006), ya que de algunas proteínas de los alimentos, principalmente de las proteínas de la leche, se obtienen péptidos biológicamente activos, de entre los cuales se ha demostrado la existencia de péptidos con actividad inhibitoria de ACE y sin efectos secundarios (Guan-Hong y col., 2004).

La enzima convertidora de angiotensina es una metalopeptidasa con centro catalítico de Zn, que se expresa como una ectoenzima unida a la membrana en células endoteliales. Esta peptidasa se encuentra localizada en múltiples zonas del organismo como pulmón, riñón, corazón, músculos, páncreas, cerebro, arterias, útero e intestino. Los péptidos inhibidores de ACE son de pequeño tamaño, muchos di y tripéptidos, que son absorbidos fácil y rápidamente en el intestino. Pueden entrar en el sistema circulatorio e inhibirla, lo que genera una baja de presión arterial (Vioque y Millán, 2005).

Los péptidos inhibidores de ACE han sido producidos por hidrólisis enzimática de las proteínas de la leche, por la fermentación de ésta con diferentes variedades de microorganismos o por síntesis química de los péptidos correspondientes a las secuencias de las proteínas de la leche (Leclerc y col., 2002). Takano (2002) purificó dos tipos de péptidos de una leche fermentada, Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro; los cuales producen 50% de inhibición de ACE con 9 y 5µmol/L respectivamente. La secuencia aminoácida Val-Pro-Pro se encuentra en la estructura primaria de la caseína β (84-86) y la secuencia Ile-Pro-Pro, en la caseína β (74-76) y caseína κ (108-110). Los fragmentos de las caseínas que presentan un efecto antihipertensivo se denominan casoquininas y los derivados de las proteínas del suero lactoquininas (Meisel, 2001).

Maeno y col. (1996), reportaron que los péptidos inhibidores de ACE producidos por la fermentación de la leche, pueden ser modificados por la acción de enzimas digestivas. Demostraron que la hidrólisis del péptido β 169-175 con carboxipeptidasa A, provocó una disminución en su actividad inhibitoria de ACE in vitro, sin embargo, después de su ingestión oral por ratas hipertensivas se obtuvó una reducción significativa en la presión sanguínea. Estos resultados sugirieron que las enzimas digestivas juegan un papel importante en la bioactividad de péptidos, y que los estudios in vivo son esenciales para demostrar su potencial como ingredientes nutracéuticos (Leclerc y col. 2002).

Leches fermentadas por varias especies de *L. helveticus* han mostrado actividad antihipertensiva, sin embargo; leches fermentadas por especies de otras bacterias ácido lácticas como *L. delbrueckii subs. bulgaricus, L. casei, L. acidophilus, L. delbrueckii subs.lactis, Streptococcus thermophilus, L. lactis subs. lactis y L. lactis subs.cremoris no muestran una actividad antihipertensiva significativa* (Takano, 2002).

Los mejores alimentos antihipertensivos conocidos son los productos lácteos fermentados Calpis y Evolus. La primera documentada en el mercado japonés fue Calpis, la cual es fermentada con una combinación de *Lb. helveticus CP790 y Saccharomyces cerevisiae* y contiene dos tripéptidos inhibidores de ACE VPP e IPP provenientes de las caseínas. Evolus fue la primera leche fermentada europea diseñada para ayudar a disminuir la presión sanguínea, es fermentada por *Lb. helveticus LBK16H* y contiene los mismos tripéptidos. Gracias a que las caseínas (αs1, αs2 y β), son ricas en prolina y tienen una alta flexibilidad se facilita su proteolisis, resultando en un alto grado de hidrólisis obteniéndose así una gran variedad de péptidos (Otte y col., 2007).

Tratamientos a los que se ven sometidos los productos alimenticios pueden cambiar la estructura molecular de los aminoácidos presentes en los péptidos bioactivos y de esta manera cambiar su bioactividad. El pH alcalino y el calor por ejemplo inducen racemización, pero en general el tratamiento térmico puede afectar la sensibilidad a la proteólisis y de esta forma se pueden producir cambios en los péptidos producidos afectando la cantidad y calidad de los

antihipertensivos e inhibidores de ACE que se originan de estas proteínas (López-Fandiño y col., 2006).

Jauhiainen (2007), conjunta en una revisión varios estudios epidemiológicos, que sugieren que el consumo de leche y productos lácteos están relacionados inversamente con el riesgo de hipertensión, se ha demostrado en algunos estudios que el consumo de productos lácteos reduce la presión sanguínea también, además, en estudios clínicos se demostró que leches fermentadas con *L. helveticus* y las cuales contienen Pro-Pro y Val- Pro-Pro disminuyen la presión sanguínea sistólica y diastólica en sujetos hipertensos. Por otra parte otro estudio (Dietary Approaches to Stop Hipertensión (DASH)) con 500 individuos ligeramente hipertensos mostró que una dieta rica en frutas, vegetales y productos lácteos bajos en grasa reducen la presión sanguínea significativamente

3.5.6 Péptidos Antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos son derivados de la proteína de suero lactoferrina, ésta es una glicoproteína unida a hierro incluida en muchos fluidos biológicos de mamíferos incluida la leche. Es considerada como un componente importante en la defensa del huésped contra infecciones microbianas (Meisel, 1997).

Varios reportes se han enfocado en péptidos antimicrobianos generados por digestión proteolítica de lactoferrina; los hidrolizados fueron activos contra microorganismos gram-postivos (*Bacillus, Listeria y Streptococcus*) y gram-negativos (*E. coli, Klebsiella, Salmonella, Proteus y Pseudomonas*). Un péptido bactericida potente generado por digestión de lactoferrina con pepsina es la lactoferricina B, que también demostró actividad antimicrobiana hacia microorganismos gram-positivos y gram-negativos (Clare y Swaisgood, 2000).

La lactoferricina B tiene propiedades antimicrobianas más potentes que la lactoferrina, esto sugiere que su tamaño más pequeño puede facilitar el acceso a sitios de la superficie microbiana. La actividad antimicrobiana de la lactoferricina y de análogos sintéticos parece estar correlacionada con la carga neta positiva de

los péptidos; estos péptidos cationicos matan a microorganismos sensibles por incremento en la permeabilidad de la membrana celular (Meisel, 1997).

Por otra parte la leche también contiene péptidos que exhiben propiedades antifungicas, la actividad antifungica de la lactoferrina u otros péptidos (lactoferricina B) en combinación con agentes antifungicos, ha sido demostrado con *Candida albicans.* Varios hongos filamentosos, incluyendo agentes de enfermedades de la piel fueron también sensibles a esta mezcla (Clare y Swaisgood, 2000).

3.5.7 Péptidos con otras actividades biológicas

3.5.7.1 Péptidos Citomoduladores

Los péptidos citomoduladores, pueden disminuir la viabilidad de células cancerígenas. En péptidos encontrados en queso Gouda se observó que inhiben la proliferación de las células de la leucemia aún en bajas concentraciones como 1pM/L; este efecto puede ser el resultado de la apoptosis inducida por los péptidos en donde se observa que las células cancerosas son más reactivas con éstos que las células no cancerosas.

El sitio primario para que se lleve a cabo este proceso de apoptosis selectiva de las células malignas, podría ser el tracto intestinal. Los efectos de los péptidos citomoduladores y de los péptidos inmunomoduladores en la viabilidad y la respuesta inmune de las células podrían ser el mecanismo mediante el cual los péptidos bioactivos pueden ejercer efectos protectivos en el desarrollo de tumores (Meisel, 2001, 2005).

3.5.7.2 Péptidos Antioxidantes

El papel de los radicales libres y de las especies oxigeno activas en varias enfermedades, incluyendo envejecimiento, cáncer y la toxicidad de numerosos compuestos ha sido investigado. Para combatir el estrés oxidativo, el cuerpo debe contar con un suplemento constante de antioxidantes a través de la dieta. Motivo

por el cual actualmente la búsqueda de antioxidantes naturales como alternativa es de gran interés (Hernández-Ledesma y col. 2005).

Las propiedades antioxidantes que previenen la peroxidación enzimática y no enzimática de ácidos grasos esenciales han sido encontradas en péptidos derivados de las proteínas de la leche. La mayoría de estos péptidos han sido encontrados en la secuencia de la caseína α (Hartmann y Meisel, 2007). Otros péptidos derivados de la digestión de caseína β exhiben una inhibición en la actividad de la lipoxigenasa; uno de estos péptidos antioxidantes (177-183) fue identificado como un agente antihipertensivo llamado casokinina; más específicamente, las actividades antihipertensivas y antioxidantes podrían estar relacionadas con péptidos antioxidantes intracelulares los cuales también exhiben una actividad inhibitoria de ACE. Similarmente el octapéptido captopril, droga que comúnmente es usada para el tratamiento de hipertensión, también exhibe propiedad antioxidante (Hernández-Ledesma y col. 2005).

3.6 Alimentos Funcionales

El mercado de los alimentos funcionales esta creciendo en un rango de 15-20% por año. Estos alimentos, conocidos también como nutraceúticos, alimentos diseñados, alimentos medicinales, alimentos terapéuticos, etc., se definen como alimentos que contienen componentes promotores de la salud más allá de los nutrientes tradicionales.

Los alimentos pueden ser modificados por la adición de fitoquímicos, péptidos bioactivos, ácidos grasos poliinsaturados ω-3, probióticos y/o prebióticos para que puedan llegar a ser alimentos funcionales (Shah, N. 2001).

Uno de los factores que contribuye al crecimiento continuo de los alimentos funcionales es el incremento en la desregulación metabólica en la población, que provoca problemas de salud tales como obesidad, arteriosclerosis, diabetes e hipertensión. Siendo así las causas y consecuencias de enfermedades metabólicas diferentes para cada individuo; ya que el metabolismo se encuentra estrechamente relacionado con la dieta y con el estilo de vida de cada persona,

por lo que cambios en la alimentación puede ser la clave para resolver los problemas.

Actualmente, diseñar alimentos saludables es relativamente fácil, pero diseñarlos y que al mismo tiempo sean del gusto del público, es el reto, porque el gusto por los alimentos es una parte íntima y, muchas veces, exclusivo de cada persona. Por varios siglos, el placer de alimentarse ha llegado a ser uno de los principales placeres de la vida, razón por la que los consumidores que pueden escoger de entre un amplio rango de posibilidades alimenticias, no desean cambiar fácilmente sus sabores, olores y texturas a que están acostumbrados simplemente por "mejorar su salud".

Por lo tanto, los alimentos funcionales deben ser simultáneamente seguros, deliciosos, convenientes y aceptables, es decir, deben de ser capaces de mantener el valor extrínseco existente mientras que al mismo tiempo alteran su composición para complementar valores intrínsecos específicos en la salud (Bruce German y col. 2004).

Existen varias formas en la que los alimentos pueden ser modificados con el objetivo de obtener determinada funcionalidad y de éstas modificaciones dependerán las características finales del alimento (Tabla 5).

Tabla 5. Tipos de modificaciones para la obtención de alimentos funcionales

Tipo de Modificación	Ejemplos de Posible Funcionalidad
Adición de fotoquímicos	Antioxidante, disminución de riesgo de enfermedades cardiovasculares, disminución de riesgo de cáncer, disminución de presión sanguínea.
Adición de péptidos bioactivos	Mejoramiento de la función inmune, mejoramiento de la biodisponibilidad de minerales, efecto hipotensivo.
Adición de fibra dietética	Prevención de constipación, disminución de

	riesgo de cáncer de colón, disminución de colesterol en sangre.
Adición de ácidos grasos poliinsaturados ω-3	Disminución de riesgo de ataque cardiaco, disminución de riesgo de algunos cánceres, Mejoramiento del sistema inmune.
Adición de probioticos	Mejoramiento de la función gastrointestinal, Mejoramiento del sistema inmune, disminución de riesgo de cáncer de colón.
Adición de prebioticos	Mejoramiento de la función gastrointestinal, Mejoramiento del sistema inmune, disminución de riesgo de cáncer de colón.

Los alimentos funcionales se clasifican en tres grupos: Probióticos, Prebióticos y Biogénicos. Un inconveniente es la legislación de los alimentos, por ejemplo, en EU aún no se han reconocido los alimento funcionales como una categoría distinta de alimentos. Sin embargo, Japón fue el primer país en adoptar en su sistema legal a alimentos funcionales con clasificación FOSHU (Alimentos para uso específico en la salud). Algunos productos que contienen péptidos antihipertensivos fueron reconocidos por dar un resultado exitoso en pruebas humanas y fueron clasificados como FOSHU. (Meisel, 2001; Yamamoto, 2003).

Actualmente en Japón se comercializa un producto FOSHU que contiene un decapéptido de la caseína αS1 (f23-34), el cual ha demostrado acción preventiva en la hipertensión y en los trastornos del sistema circulatorio y también se comercializa una bebida bajo el nombre de Casein DP Peptio Drink, que aporta el mismo beneficio (Hartman y Meisel, 2007). Por otra parte en Europa las leches fermentadas Evolus y Ameal S contienen los tripéptidos Val-Ile-Pro e Ile-Pro-Pro, los cuales han demostrado tener actividad inhibitoria de ACE y por lo tanto pueden ejercer un efecto antihipertensivo (FitzGerald y Murray, 2006). Recientemente se están comercializando otros alimentos funcionales con

péptidos bioactivos como el Biozate y el Bio Pure GMPproducidos por la compañía estadounidense DAVISCO.

Tabla 6. Alimentos funcionales disponibles comercialmente e ingredientes alimenticios que contienen péptidos bioactivos

Producto	Tipo de Producto	Péptido Funcional	Efecto sobre la salud	Empresa
Calpis	Suero de leche	VPP, IPP derivados de β y κ-CN	Reducción de la presión sanguínea	Calpis Co., Japan
Evolus	Bebida láctea fermentada enriquecida con calcio	VPP, IPP derivados de β y κ-CN	Reducción de la presión sanguínea	Valio Oy, Finland
BioZate	Hidrolizado de proteínas de suero aisladas	Fragmentos de β-lactoglobulina	Reducción de la presión sanguínea	Davisco, USA
Bio PURE-GMP	Aislado de proteínas de suero	Glicomacropeptido fracción 106-169 de κ-CN	Prevención de caries dental, protección contra virus y bacterias	Davisco, USA
PRODIET F200/lactium	Bebida láctea saborizada/capsulas	αs1-CN f(91-100) (Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg)	Reducción de los efectos del stress	Ingredia, France
Festivo	Queso fermentado duro bajo en grasa	αs1-CN f(1-9), αs1-CN f(1-7), αs1-CN f(1-6)	Hasta el momento ninguna	MTT Agrifood Research Finland
Cysteine peptide	Ingrediente/Hidrolizado	Péptidos derivados de las proteínas de la leche	Para aumentar el nivel de energía y sueño	DMV International, the Netherlands
C12	Ingrediente/Hidrolizado	Péptidos derivados de CN	Reducción de la presión sanguínea	DMV International, the Netherlands
Capolac	Ingrediente	Caseinofosfopeptidos	Absorción	Arla Foods

			de minerales	Ingredients, Sweden
PeptoPro	Ingrediente/Hidrolizado	Péptidos derivados de CN	Mejora en el rendimiento atletico.	DSM Food Specialties, the Netherlands
Vivinal Alpha	Ingrediente/Hidrolizado	Péptidos derivados de suero	Relajación y sueño	Borculo Domo Ingredients (BDI), the Netherlands

Modificado de Korhonen y Pihlanto, 2006 y Hartmann Meisel ,2007

4 Hipótesis

El Sofúl, producto lácteo fermentado por *L. casei Shirota* (probiótico), y la bacteria ácido láctica *Streptococcus thermophillus* presenta péptidos derivados de las proteínas de la leche que pueden presentar bioactividad.

5 Objetivos

5.1 Objetivo General

Determinar el perfil de péptidos bioactivos presentes en el Sofúl.

5.2 Objetivos Particulares

- Determinar la concentración de péptidos durante el almacenamiento.
- Determinar el peso molecular de los péptidos encontrados.
- Fraccionar los péptidos del Sofúl mediante cromatografía de exclusión molecular y fase reversa.
- Determinar la actividad antihipertensiva de las fracciones encontradas en el producto lácteo fermentado (Sofúl).
- Calcular la concentración de inhibición media (IC_{50}) de los péptidos con actividad antihipertensiva.

6 Metodología

El diseño experimental general se resume en la figura 4

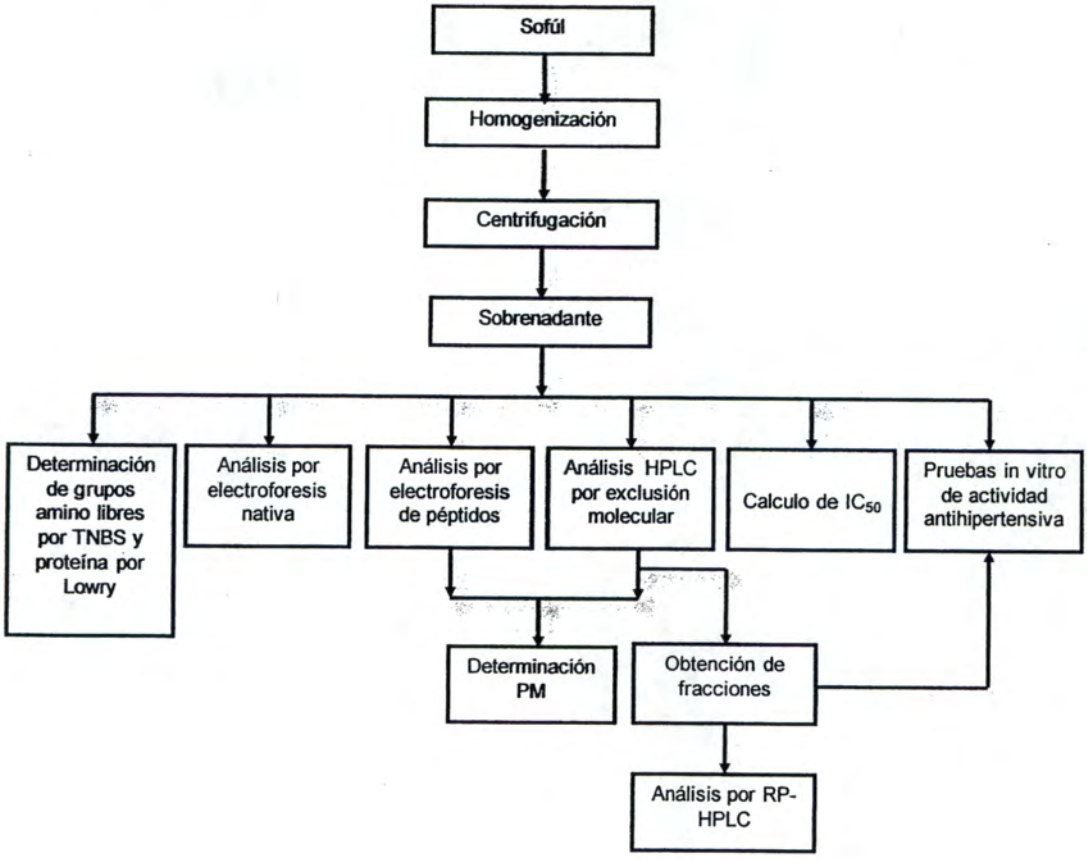


Figura 4. Diseño experimental para el análisis de los péptidos bioactivos del Sofúl.

6.1 Toma de Muestra

Se tomaron cinco envases del producto del mismo lote y fecha de caducidad. Se homogeneizaron en un matraz erlenmeyer estéril de 500ml. Este fue mantenido en refrigeración a 4°C durante 18 días y se tomaron muestras de 10g por triplicado en condiciones estériles cada 48 horas. Las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm a 4°C por 30 min, se recuperó el sobrenadante y se congeló a -20°C.

6.2 Recuento microbiano

Para evaluar el número de microorganismos viables durante el almacenamiento, así como el posible crecimiento de éstos, se empleó el método modificado de siembra en superficie (Corona y Jiménez, 2004).

Procedimiento:

Se realizaron diluciones ($1x10^{-4}$) en tubos de agua peptonada al 1%, se sembraron placas de agar MRS con 5µL de cada dilución por triplicado, una vez sembradas se dejaron una hora aproximadamente hasta que la gota fuera absorbida para finalmente incubar a 37°C por 36hr.

6.3 Determinaciones

6.3.1 Proteína por el Método de Lowry

El método de Lowry y col. (1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteína.

Este método consta de dos etapas:

1) Los iones Cu^{2+}, en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+}-proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.

2) Reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteau por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteau es el ácido

fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.

Procedimiento:

1) Poner 1mL de muestra
2) Adicionar 5mL de Reactivo (50 volumenes de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1N + 1 volumen de $CuSO_4$ al 1% en H2O + 1 volumen de Tartrato de Na y K al 2% en H2O)
3) Reposar 10min en la oscuridad
4) Agregar 0.5mL de Fenol Folin Cicocalteu al 50% en H2O
5) Dejar reposar por 30 min en la oscuridad
6) Finalmente leer a 590nm.

(Curva Patrón ver anexo 10.1.2)

6.3.2 Grupos Amino Libres por el método del Ácido Trinitrobencensulfonico (TNBS)

Para cuantificar la concentración de péptidos en el producto lácteo fermentado (sofúl) durante el almacenamiento, se realizó la determinación de péptidos solubles empleando la técnica del ácido trinitrobencensulfonico (TNBS). Este método surgió como una necesidad de determinar el grado de hidrólisis de las proteínas de los alimentos.

Primero se utilizó 2,4-dinitrofluorobenceno para la estimación de grupos amino libres en proteínas y residuos de péptidos. Posteriormente el ácido 2,4,6-trinitrobencensulfonico fue introducido como un reactivo para grupos amino, especialmente para aminoácidos y péptidos (Goodwin and Siu-Ying Choi, 1970).

El método de TNBS se basa en la determinación de grupos amino primarios; éste es una prueba espectrofotométrica del cromoforo formado por la

reacción del TNBS con el grupo amino terminal. La reacción se lleva a cabo bajo condiciones ligeramente alcalinas y es terminada con niveles bajos de pH. El TNBS reacciona con los grupos amino para formar el derivado trinitrofenil (TNP) el cual posee un espectro máximo de 340 y 420nm; así la concentración de TNBS en la reacción es muy importante porque afecta la absorbancia del complejo TNP-Proteina-Sulfito. Este método es muy empleado para la determinación de grupos amino libre de las proteínas e hidrolizados de proteínas (Adler-Nissen, 1979; Goodwin and Siu-Ying Choi, 1970).

Estudios han demostrado la dependencia del pH y solo los grupos amino sin protonar son las especies reactivas. También se demostró que la reacción no es específica, ya que el grupo sulfihidrilo (SH) de la cisteína reacciona más rápido que los grupos amino (Freedman and Radda, 1968).

Este método de cuantificación detecta hasta 20µg de proteína, por otra parte el reactivo es soluble en agua, es considerablemente estable y no reacciona con urea, amonio o largas cadenas de histidina, tirosina treonina y serina. Pero el TNBS también reacciona lentamente con iones hidroxilo, por lo cual la lectura del blanco aumenta, incremento estimulado por la luz motivo por el cual la reacción se debe de llevar a cabo en la obscuridad (Adler-Nissen, 1979, Freedman and Radda, 1968; Goodwin and Siu-Ying Choi, 1970).

Procedimiento:

1. Poner 2mL de buffer de fosfatos 0.2125M y pH 8.2.
2. Adicionar 250µL de muestra
3. Adicionar 2mL de TNBS al 0.10% en buffer de fosfatos o.2125M y pH 8.2.
4. Agitar bien en un vortex y calentar a 50°C por una hora en la obscuridad
5. Transcurrida la hora de reacción, detenerla adicionando 4mL de HCl 0.1N.
6. Por último agitar bien en un vortex y leer a 340nm contra un blanco elaborado con los reactivos y agua desionizada.

NOTA:

- El agua empleada para diluir mis muestras 1:5 fue desionizada.
- El TNBS se prepara hasta el momento de su uso y se protege en todo momento de la luz.

(Curva Patrón ver anexo 10.1.1)

6.4 Electroforesis SDS-PAGE-TRICINA

La electroforesis es un método analítico semipreparativo, en el que las biomoléculas migran hacia el cátodo (tienen carga neta positiva, es decir está por debajo de su punto isoeléctrico) o ánodo (tienen carga neta negativa, es decir está por arriba de su punto isoeléctrico) en dependencia entre otros factores de su carga (dada por el pH del medio, y puede cambiar por interacción con iones u otras macromoléculas), peso molecular y estructura tridimensional. Estos métodos se caracterizan por ser de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad.

El sistema SDS-PAGE consiste de dos geles contiguos pero distintos: Un gel separador (abajo) y un gel concentrador (arriba), estos difieren en porosidad, pH y fuerza iónica; y además consiste en la utilización de SDS, detergente anionico que se une a las proteínas en aproximadamente 1.4mg de SDS /mg de proteína, impartiendo una carga negativa al nuevo complejo formado. Así, las proteínas primero son concentradas en el gel concentrador, posteriormente migran hacia el ánodo y llegan a la interface entre el gel concentrador y el gel separador donde ocurren cambios en la movilidad debido al pH, fuerza iónica y porosidad del gel separador y así finalmente el complejo SDS-Proteina es separado en el gel separador en base a su peso molecular, donde los complejos de bajo peso molecular migran más rápido que los de peso molecular alto (García, 2000; Garfin, 1990).

La electroforesis se utiliza preferentemente en la química de los alimentos como comprobación y con menos frecuencia para determinaciones cuantitativas,

especialmente usada en la investigación para la determinación de proteínas y para la preparación de sustancias puras como enzimas o inhibidores enzimáticos.

Esta técnica es útil para la separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas aportando un importante grado de pureza, además también es útil para determinar otros parámetros de interés como lo es el peso molecular, punto isoeléctrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas (Maier, 1982; García, 2000).

Es importante mencionar que la velocidad de migración electroforética depende de la densidad de carga de la molécula (relación carga/peso), de la porosidad del gel de electroforesis y del voltaje aplicado, el cual no debe incrementarse demasiado ya que se puede generar un calor excesivo, el cual puede causar la distorsión de las bandas y por otra parte un voltaje bajo provoca un separación pobre (García, 2000; Garfin, 1990).

- Formación del gel de Poliacrilamida

El gel se forma por la polimerización vinílica del monómero acrilamida y del monómero entrecruzador N,N´-bis-acrilamida; así el mecanismo de formación del gel es la polimerización catalizada por radicales libres generados por el persulfato de amonio (agente oxidante) y un acelerador, el N,N,N,N´-tetrametilen-diamina (TEMED, agente reductor); así, el TEMED causa la formación de radicales libres del persulfato y estos en turno catalizan la polimerización (García, 2000; Garfin, 1990).

Cabe mencionar que el oxígeno interfiere con la polimerización, por tal motivo, es necesario desgasificar la solución de acrilamida para remover el oxígeno disuelto antes de adicionar el TEMED y el persulfato de amonio (Garfin, 1990).

Para la formación de un gel también es importante conocer dos parámetros importantes:

- ✓ %T; Representa el porcentaje en peso del monómero total empleado (acrilamida + bis-acrilamida (entrecruzador) en gramos por 100mL) y determina la longitud promedio de la cadena del polímero. Así en términos generales al aumentar el valor de T, el tamaño del poro disminuye.

- ✓ %C: Es la concentración de bis-acrilamida y representa el porcentaje de este monómero en el gel y determina el grado de entrecruzamiento.

Procedimiento:

1. Peparar el gel separador (2.8cm de altura) 16.5%T, 3%C y poner a desgasificar por 15 min. antes de adicionar el persulfato de amonio al 10% y el TEMED para su gelificación.

2. Peparar el gel espaciador (2.5cm de altura) 10%T, 3%C y poner a desgasificar por 15 min. antes de adicionar el persulfato de amonio al 10% y el TEMED para su gelificación.

3. Peparar el gel concentrador (2cm de altura) 4%T, 3%C y poner a desgasificar por 15 min. antes de adicionar el persulfato de amonio al 10% y el TEMED para su gelificación.

4. Tomar 20 µL de muestra y adicionarle 10 µL de buffer de muestra. Para el estándar de polipéptidos tomar 3 µL y adicionarle 60 µL de buffer de muestra.

5. Incubar las muestras a 40°C por 30min y el estándar incubarlo a ebullición por 5min.

6. Poner el buffer de cátodo hasta que cubra por completo los cristales, y posteriormente poner el buffer de ánodo hasta que éste alcance a cubrir la mitad del volumen total de la cámara.

7. Inyectar 25 µL de muestra por carril

8. Correr a temperatura ambiente, a 30V hasta que las muestras salgan del pozo (aproximadamente 1h) y cuando entren por completo al gel concentrador, correr a 90V constante.

9. Fijar con 50% metanol y 10% ácido acético por 30 min.

10. Teñir con 0.025% Azul de Commassie an 10% ácido acético por 1h.

11. Desteñir con 19%ácido acético por 2h, cambiando la solución desteñidora cada 30min.

6.5 Prueba in vitro de Actividad Antihipertensiva

La enzima convertidora de angiotensina (ACE), (EC 3.4.15.1) es una glicoproteína que se encuentra en varios tejidos, consiste de una cadena de residuos de aminoácidos sencilla, con un peso molecular de 130 kDa a 150 kDa. Es responsable de la conversión de angiotensina I al vasoconstrictor angiotensina II y de la inactivación del péptido hipotensivo bradiquinina. Su sitio activo ha sido el blanco principal para el desarrollo de inhibidores competitivos que tienen uso clínico como medicamentos antihipertensivos (Zola y Horovitz, 1981).

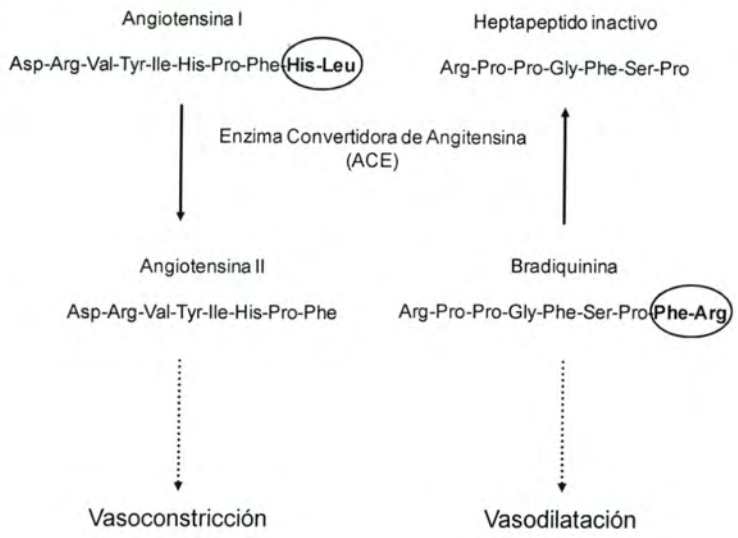


Figura 5. Reacciones catalizadas por la Enzima Convertidora de Angiotensina (ACE). Hidroliza el decapéptido Angiotensina I en el Octapéptido Angiotensina II el cual es un potente vasoconstrictor e hidroliza a la Bradiquinina la cual es un potente vasodilatador dejándola inactiva.

ACE tiene una gran afinidad por péptidos que poseen un aminoácido aromático, preferentemente la fenilalanina, en la antepenúltima posición, como es el caso de la angiotensina I y la bradiquinina; de estas últimas, ACE tiene mayor afinidad por la bradiquinina. Los péptidos antihipertensivos, generalmente, son cortos con un residuo de prolina en el extremo carboxilo terminal. La prolina es conocida por ser resistente a la degradación por enzimas digestivas y puede pasar del intestino delgado al torrente sanguíneo en la secuencia de péptido corto (Donkor y col., 2007).

La región del sitio activo que se une a los tres últimos residuos de aminoácido del extremo carboxilo terminal del péptido sustrato es conocido como "sitio de unión obligatorio"; dentro del cual, el subsitio S1 tiene afinidad por cadenas laterales aromáticas, el subsitio S1' no interactúa con prolina y el subsitio S2' no tolera cadenas de aminoácidos dicarboxílicos. Además, un grupo cargado positivamente en el sitio activo de la enzima forma un enlace iónico con el grupo carboxilo terminal del sustrato cargado negativamente y de esta manera inicia la alineación correcta de los aminoácidos restantes del sustrato con los subsitios del sitio activo. Sin embargo, la presencia de un ácido glutámico cargado negativamente en el extremo carboxilo terminal podría resultar en una unión débil por lo que se disminuiría el potencial inhibitorio de estos péptidos (Otte y col., 2007; Zola y Horovitz, 1981).

El pH óptimo de ACE varia en relación con el sustrato empleado y también es influenciado por la presencia de iones cloro, es decir el pH óptimo para hidrolizar péptidos grandes, como la angiotensina y la bradiquinina en presencia de iones cloro, es 7.5, mientras que para tripéptidos como el HHL su actividad optima en presencia de iones cloro es de 8.5 (Cushman y Cheung, 1970).

Los agentes quelantes como el EDTA, componentes sulfhidril y los iones de metales pesados, inhiben ACE probablemente por afectar la unión de ésta con su ión metálico el cual es necesario para su actividad. ACE se inhibe completamente en presencia de EDTA que, aunque sea removido por diálisis, su actividad no se restablece; sin embargo puede reactivarse por la adición de iones divalentes como el Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+}, etc. De estos, Zn^{2+} restablece el 100%

de actividad, esto se debe a que la enzima contiene un ión Zn fuertemente unido esencial para la reacción hidrolítica que ésta cataliza (Zola y Horovitz, 1981).

El mecanismo de inhibición de los péptidos de veneno de víbora parece ser debido a que éstos compiten con el sustrato por la unión al sitio activo de la enzima. Se unen a la enzima de la misma manera que el sustrato, pero la preferencia por el inhibidor parece ser el resultado de interacciones adicionales con la región adyacente al sitio activo de la enzima conocido como "sitio de unión auxiliar" (Cushman y Cheung, 1970; Zola y Horovitz, 1981).

- Ensayo de la actividad inhibitoria de ACE

Muchos de los estudios sobre la capacidad inhibitoria de ACE por péptidos han usado el método de Cushman y Cheung (1971), se basa en la división del hipurril-histidil-leucina (HHL), que en su extremo carboxilo terminal, el mismo dipéptido que la angiotensina I. ACE cataliza la división del histidil-leucin (HL) y libera ácido hipúrico (HA) (Figura 6), que es cuantificado espectrofotométricamente después de su extracción con acetato de etilo (Shalaby y col., 2006).

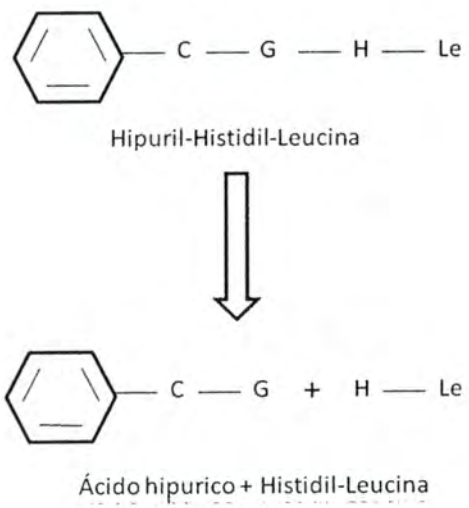


Figura 6. **Hidrólisis de Hipurril-Histidil-Leucina, sustrato usado para la medición de la actividad antihipertensiva.**

El hecho de que se haya encontrado una inhibición de ACE en hidrolizados producidos con diferentes enzimas y condiciones de hidrolisis diferentes, indica que una variedad de péptidos de composición aminoácida distinta son capaces de inhibir a ACE. Por lo que la capacidad de una leche fermentada para inhibir a ACE va a depender de la composición de péptidos que ésta contenga, dicha composición, a su vez va a depender de las enzimas que se encuentren en el medio así como de la concentración de éstas y del tiempo de fermentación (Cornelly van der Ven y col. 2002).

Procedimiento:

1. Al sobrenadante ajustarle el pH a 8.3 con NaOH.
2. Tomar 80µL del sobrenadante a pH 8.3 y adicionar 200µL de buffer de sustrato.
3. Adicionar 20µL de enzima en una concentración de 1U/mL.
4. Incubar a 37°C por 60min, y detener la reacción adicionando 250µL de HCl 1N.
5. Adicionar 1.7mL de acetato de etilo para extraer el ácido hipúrico y centrifugar a 4500rpm durante 5min.
6. Tomar 400µL de la fase orgánica y calentar a 95°C por 30min para evaporar el acetato de etilo.
7. Resuspender adicionando 2mL de agua destilada y leer a 230nm.

NOTA:

- 100% Actividad → Usando 80µL de buffer libre de sustrato en lugar de muestra.
- 0% Actividad → Usando 20µL de agua desionizada en lugar de enzima.

6.6 Calculo de la concentración inhibitoria media (IC50)

La IC_{50} es la cantidad de compuesto químico, en este caso es la concentración de péptidos por mililitro de sobrenadante necesaria para inhibir la actividad enzimática de la enzima convertidora de angiotensina I en un 50% Para esto, el sobrenadante del producto se liofilizó para posteriormente hacer diluciones, a las que se les determinó la concentración de grupos amino libres por el método de TNBS (Adler-Nissen, 1979) y su actividad inhibidora de la ACE (Fuglsang y col. 2002). En resultados se graficó la concentración de proteína contra el porcentaje de inhibición. Se calculó la correlación y se graficó una curva de regresión. Con la pendiente y la ordenada al origen se calculó la IC_{50}.

6.7 Fraccionamiento de péptidos por exclusión molecular - HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución) y RP-HPLC (Fase Reversa HPLC)

La Cromatografía líquida de alta resolución o High performance liquid chromatography (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente. El HPLC utiliza una presión elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución. Así, esta técnica realiza la separación física de una mezcla de compuestos a través de la interacción entre solutos, la fase estacionaria y la fase móvil (Harris, 2001).

La elución isocrática se lleva a cabo con un único disolvente (o una mezcla de disolventes fija); el compuesto pasa por la columna cromatográfica mediante el bombeo de la fase móvil a alta presión (la cual incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro la columna y reduce así su difusión dentro la columna mejorando la resolución de la cromatografía); la muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que atraviesan la columna. El grado de retención de los componentes de

la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo de retención es el tiempo que tarda un compuesto en ser eluido en la columna y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener mezclas de amortiguadores, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos. Si un disolvente no permite una elución suficientemente rápida de todos los componentes, se puede usar una elución por gradiente. En este caso, se van añadiendo cantidades crecientes del disolvente B al disolvente A, produciendo así un gradiente continúo. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto. El gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria. En el ejemplo, utilizando un gradiente agua/acetonitrilo los compuestos más hidrofílicos eluirán a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de acetonitrilo. A menudo, hace falta realizar una serie de pruebas previas para optimizar el gradiente de forma que permita una buena separación de los compuestos (Harris, 2001; Skoog, 1979)

Actualmente, la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) está siendo ampliamente usada, ésta es una herramienta bien establecida para el análisis y purificación de biomoléculas. El papel central que RP-HPLC ahora juega en análisis y purificación de péptidos y proteínas es la resolución; ya que RP-HPLC es capaz de separar polipéptidos de secuencias muy similares; incluso polipéptidos los cuales difieren por un simple residuo de aminoácido puede ser a veces ser separado por RP-HPLC. Esta técnica es usada para la separación de fragmentos de péptidos de digestión enzimática y para la purificación de péptidos naturales y sintéticos (The Handbook, 2002).

La separación de moléculas pequeñas involucra partición continua de las moléculas entre la fase móvil (es polar y cuanto menos polar es el disolvente, más fuerza eluyente tiene) y la fase estacionaria (no polar, hidrofóbica); los

polipéptidos se sientan en la fase estacionaria, con la mayoría de la molécula expuesta a la fase móvil y solo una parte de la molécula (pie hidrofóbico) en contacto con la superficie de la fase reversa. Así RP-HPLC separa polipéptidos basado en diferencias sutiles en el pie hidrofóbico del polipéptido separado, donde dichas diferencias resultan de diferencias en la secuencia de aminoácidos y diferencias en la conformación (Harris, 2001; The Handbook, 2002).

Procedimiento:

Las muestras almacenadas se fraccionaron en una columna de exclusión molecular (BIOSEP-SEC-S 2000), con las siguientes condiciones cromatográficas: amortiguador de fosfatos 0.1M pH 6.8 como fase móvil, flujo de 1mL/min, la detección se realizó mediante un arreglo de diodos y temperatura ambiente. Las fracciones se recolectaron y las que presentaron actividad antihipertensiva fueron re-fraccionadas por RP-HPLC, en una columna C18 (Júpiter 5u 300Å) en 0.1%TFA/Agua como solvente A y 0.1%TFA/ACN:0.1%TFA/Agua (90:10) como solvente B, se empleó un gradiente de B de 20 a 70% con un tiempo de corrida de 30 min, un flujo de 1mL/min, detector de arreglo de diodos y temperatura ambiente.

7 Resultados

Durante el almacenamiento del producto, se tomaron muestras por triplicado cada 48 horas determinando el pH del medio (Sofúl). No se encontró una diferencia significativa a lo largo del tiempo de almacenamiento, como se puede apreciar en la figura 7, el pH promedio fue de 4.33 ± 0.007.

Se determinó el número de unidades formadoras de colonia a lo largo del almacenamiento mediante la cuenta de unidades formadores de colonia (UFC) del producto, en placa; los resultados del conteo en placa se muestran en la figura 8.

Éstos mostraron una diferencia significativa a lo largo del almacenamiento, lo que concuerdan con lo reportado por Jay (2000) y por Donkor (2007) quien observó un incremento en la concentración celular de dos yogurts durante el almacenamiento por 28 días a 4°C, además de encontrar que *Streptococcus thermophilus, Lactobacillus acidophilus y Lactobacillus casei* no son afectados en el almacenamiento.

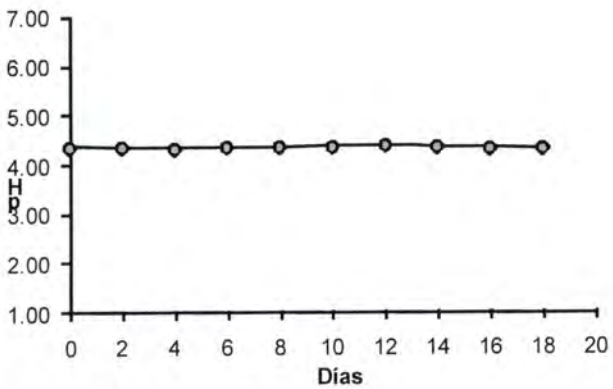


Figura 7. pH del producto lácteo fermentado (Sofúl) durante el almacenamiento.

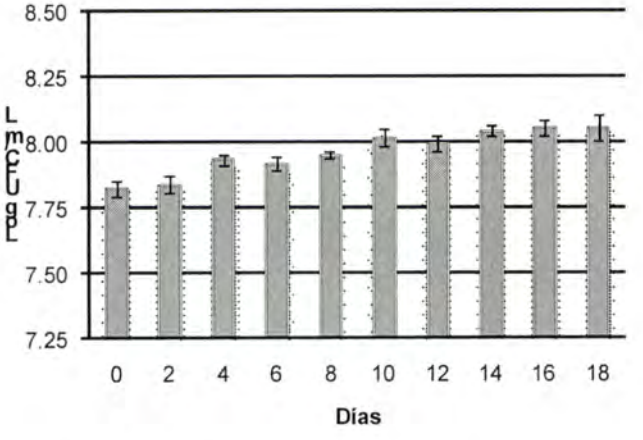


Figura 8. **Microorganismos viables del producto lácteo fermentado (Sofúl) durante su almacenamiento durante 20 días a 4°C**

Cada una de las muestras obtenidas durante el almacenamiento, se centrifugó para obtener el suero. Al sobrenadante obtenido, se le determinó la actividad antihipertensiva, ya que estudios previos han reportado la presencia de péptidos con alguna actividad biológica en productos lácteos fermentados. Al determinar el poder de inhibición de ACE al sobrenadante del producto, se encontró que a lo largo del almacenamiento (Figura 9), el poder inhibitorio promedio es de 26.8% ± 5.4 de la ACE. Estos resultados son importantes debido a que no se ha reportado hasta el momento la actividad antihipertensiva en un producto que haya sido fermentado por las bacterias ácido lácticas *L. casei Shirota* y *Streptococcus thermophillus*. Es importante recordar que el haber encontrado este poder inhibitorio de ACE en el suero del producto *in vitro*, no indica que se obtenga el mismo resultado *in vivo* ya que para poder observar el mismo efecto los péptidos que se encuentran en el producto y que son inhibidores de ACE necesitan también ser resistentes a las condiciones ácidas y a las sales biliares en nuestro organismo.

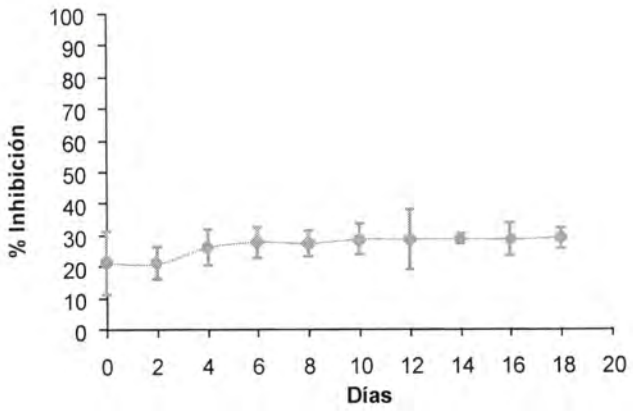


Figura 9. **Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ACE) por el producto lácteo fermentado (Sofúl) durante el almacenamiento**

El haber encontrado una actividad antihipertensiva constante, nos indico que el aumento en la concentración celular que se dio durante el almacenamiento, el cual fue mínimo, posiblemente no afecto el perfil de péptidos obtenido durante la fermentación del producto ó tal vez que una ligera proteolisis posterior a la fermentación del producto da origen a nuevos péptidos lo cual se vería reflejado en el pequeño aumento de la concentración celular. Para corroborarlo, se determinó la concentración de grupos amino libres por el método de TNBS y la concentración de proteína por el método de Lowry. Los resultados de concentración de grupos amino libres se muestran en la figura 10, se encontró una concentración promedio de grupos amino libres de 0.375 ± 0.019mg/mL sin diferencia significativa entre las muestras. También se realizó un análisis estadístico para determinar si existía una diferencia entre lotes, que no reveló diferencia significativa. Estos resultados concuerdan con la concentración de proteína determinada por el método de Lowry, en donde se observó, (Fig. 11), que no hubo diferencia significativa durante el almacenamiento del producto ni tampoco entre lotes, la concentración de proteína promedio fue de 4.588 ± 0.269 mg/mL.

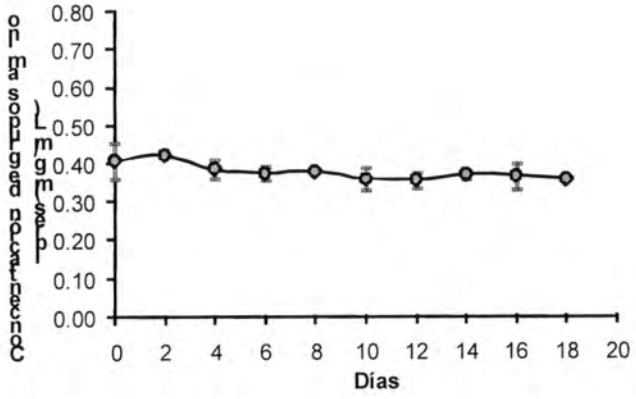


Figura 10. **Concentración de grupos amino libres del producto lácteo fermentado (Sofúl) durante el almacenamiento**

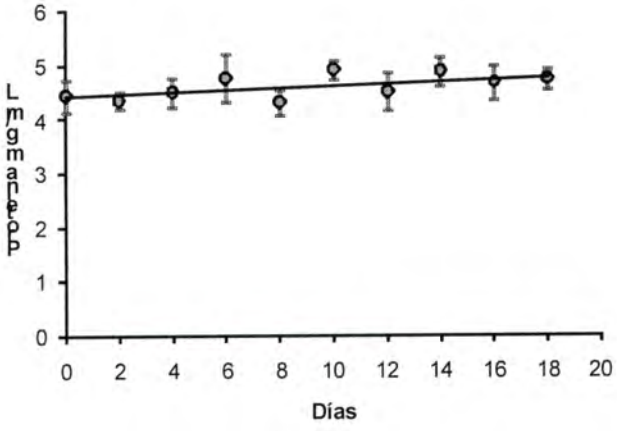


Figura 11. **Concentración de Proteína del producto lácteo fermentado (Sofúl) durante el almacenamiento**

La proteolisis va relacionada con el incremento en el número de microorganismos viables y con la disminución en la concentración de proteína, sin embargo; la concentración de proteína y de grupos amino libres en el sobrenadante no disminuyó durante el almacenamiento, esto se debe a que el aumento en el número de unidades formadoras de colonia durante el periodo de 18 días fue minimo, es decir, no hay crecimiento microbiano por lo que la proteolisis de las proteínas y el consumo de péptidos no es evidente; las concentraciones de proteína y grupos amino libres permanecen constantes y no

podemos asegurar que no se lleva a cabo una proteolisis durante el almacenamiento.

Se realizó un análisis por electroforesis nativa en geles de poliacrilamida del sobrenadante para observar el perfil de las proteínas de la leche presentes en él y para corroborar la existencia de péptidos.

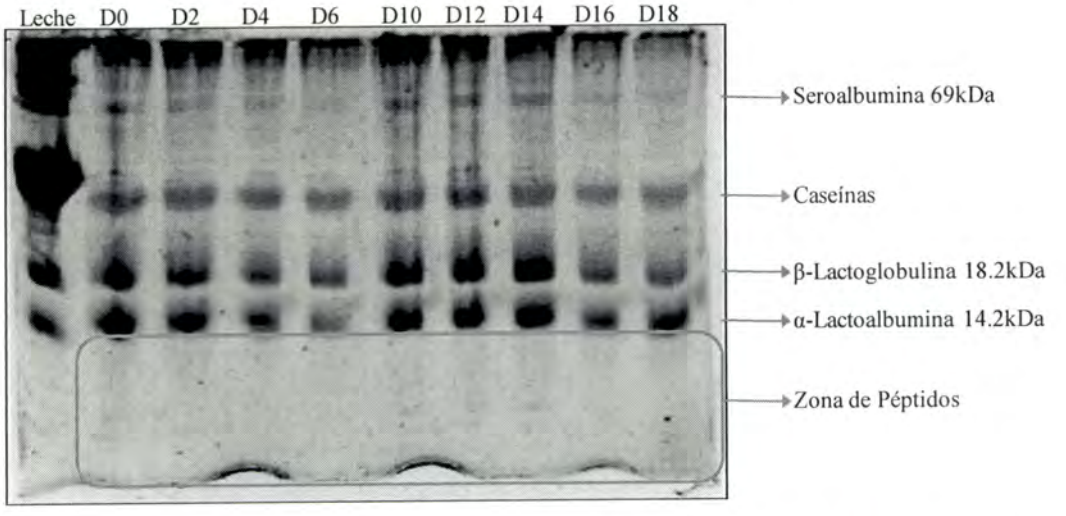


Figura 12. Electroforesis Nativa del producto lácteo fermentado (Sofúl) durante el almacenamiento. Aquí se muestra un estándar de leche en el primer carril y en los demás carriles el sobrenadante del producto a diferentes días de almacenamiento. En donde D0 es el primer día de almacenamiento con 20 días antes de la fecha de caducidad y así sucesivamente hasta D18, donde el producto tiene 18 días de almacenamiento y 2 días antes de la fecha de caducidad. Para este gel se empleo 17.5 %T y 2.67%C para el gel separador y 4%T y 2.67%C para el gel concentrador, teñido con Sypro Rubi.

Como se puede apreciar en la figura 12, la electroforesis nativa reveló la existencia de péptidos en el sobrenadante del producto (Sofúl), con pesos moleculares menores a 14KDa, estas bandas tienen gran importancia ya que los péptidos reportados como bioactivos tienen pesos moleculares menores a éste valor. Smacchi y Gobbetti (2000) reportaron la existencia de fracciones peptídicas en el yogurt de hasta 10KDa que presentan actividades biológicas. Sin embargo, la electroforesis nativa no es considerada una buena técnica para moléculas tan pequeñas como lo son los péptidos y debido a ello, para poder estimar un peso molecular más exacto de éstos se hizo un análisis del suero del producto por

electroforesis SDS-PAGE-TRICINA, la cual fue desarrollada por Schägger y Von Jagow (1987) y permite la detección de péptidos de bajo peso molecular. Estos resultados se pueden apreciar en la figura 13, donde se observan dos bandas bien definidas a lo largo de todo el almacenamiento con peso molecular de 8550 y 3828 Da.

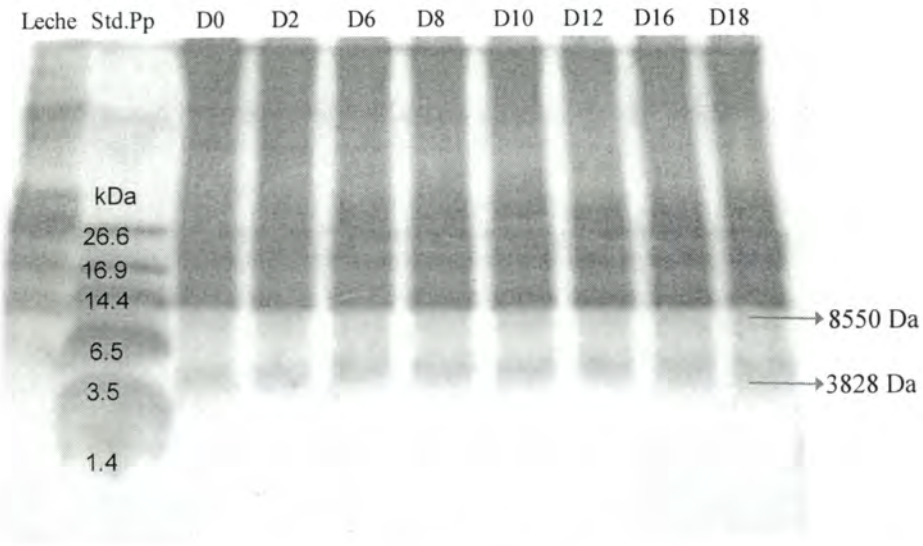


Figura 13. Electroforesis SDS-PAGE-TRICINA del producto lácteo fermentado (Sofúl) durante el almacenamiento. Aquí se muestra en el primer carril leche, en el segundo carril un estándar de polipéptidos de Bio-Rad y en los demás carriles el sobrenadante del producto a diferentes días de almacenamiento. En donde D0 es el primer día de almacenamiento con 20 días antes de la fecha de caducidad y así sucesivamente hasta D18, donde el producto tiene 18 días de almacenamiento y 2 días antes de la fecha de caducidad. Para este gel se empleo 16.5 %T y 3%C para el gel separador, 10%T y 3%C para el gel espaciador y 4%T y 3%C para el gel concentrador, teñido con Sypro Rubi

Cabe mencionar que no se puede descartar la posibilidad de que existan péptidos más pequeños, ya que esta técnica difícilmente detecta péptidos menores a 1KDa y es aún más difícil la detección si estos péptidos se encuentran en bajas concentraciones ya que éstos se salen de la matriz del gel durante la fijación, teñido y desteñido debido a su bajo peso molecular (Schägger y Von Jagow, 1987). Para corroborar la existencia de péptidos de bajo peso molecular se realizó un análisis por HPLC con una columna de filtración en gel.

En la figura 14 se muestra el cromatograma en dónde se puede observar el perfil de péptidos a lo largo del almacenamiento en donde cada color representa un día diferente. Las fracciones obtenidas en las muestras no presentan diferencias significativas en concentración durante el almacenamiento. De esta forma confirmamos, una vez más, los resultados obtenidos en la electroforesis, en la determinación de grupos amino libres (TNBS) y en la concentración de proteína (Lowry y col. 1951).

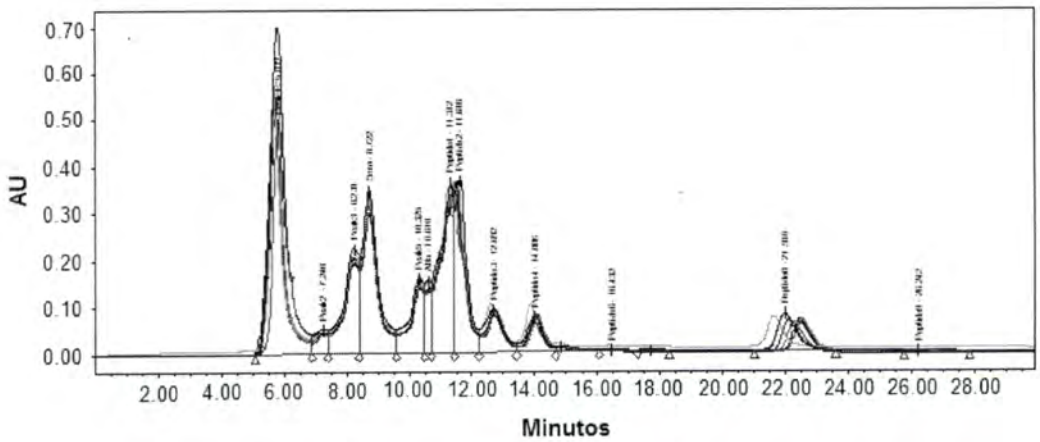


Figura 14. Cromatograma del producto lácteo fermentado (Sofúl) durante el almacenamiento por exclusión molecular HPLC a 215nm, Se utilizó una columna BIOSEP-SEC-S 2000, amortiguador de fosfatos 0.1M pH 6.8 como fase móvil, flujo de 1mL/min, la detección se realizó mediante un arreglo de diodos y temperatura ambiente

A partir de estos resultados se pudo calcular el peso molecular de las fracciones menores a 14.4KDa, peso molecular correspondiente a la proteína más pequeña de la leche, se utilizó como estándar el mismo que se usó para los geles de electroforesis. En la figura 15 se puede apreciar el cromatograma de las fracciones encontradas en donde se encontró que la fracción 1 (F1) tiene un peso molecular de 11.52 kDa, la fracción 2 (F2) de 9.18 kDa, la fracción 3 (F3) de 6.96 kDa, la fracción 4 (F4) de 2.15 kDa y la fracción 5 un peso menor a 1.42 kDa.

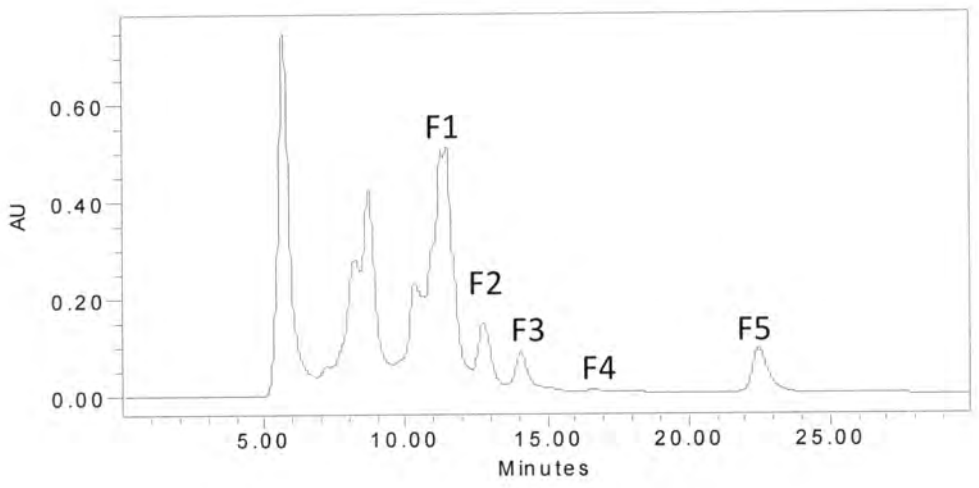


Figura 15. **Cromatograma de las fracciones encontradas en el producto lácteo fermentado (Sofúl).**

La actividad antihipertensiva de cada fracción fue determinada al inicio y al final del almacenamiento con la finalidad de observar si existían cambios en la bioactividad de éstas con el tiempo de almacenamiento. Se encontraron tres fracciones de interés (Figura 16), F1 con un peso molecular de 11.52 kDa, F3 con un peso molecular de 6.96 kDa y F5 con peso molecular menor a 1.42 kDa. F1 presentó una disminución en la actividad antihipertensiva hacia el final del almacenamiento; en F3 se encontró un porcentaje de inhibición de ACE constante y en F5 se detectó un ligero aumento del poder de inhibición de la enzima hacia el final del almacenamiento, sin embargo hacer una comparación entre las fracciones no era posible debido a que no se encontraban en las mismas concentraciones, razón por la cual se determinó la actividad específica la cual fue calculada dividiendo el porcentaje de inhibición de ACE obtenido en cada fracción entre su concentración. De esta forma, se encontró que F3 tiene el mayor poder de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I a pesar de estar presente en menor concentración que F1 y F5 lo cual indica que en esa fracción podemos tener uno o más péptidos con un poder de inhibición de ACE mayor que las otras fracciones analizadas.

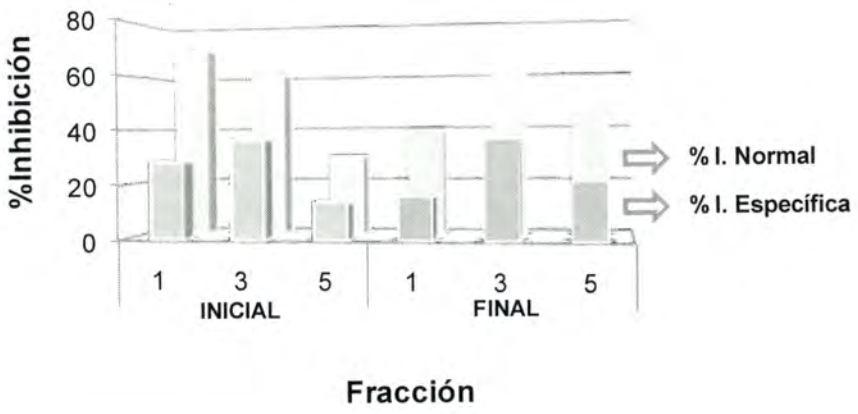
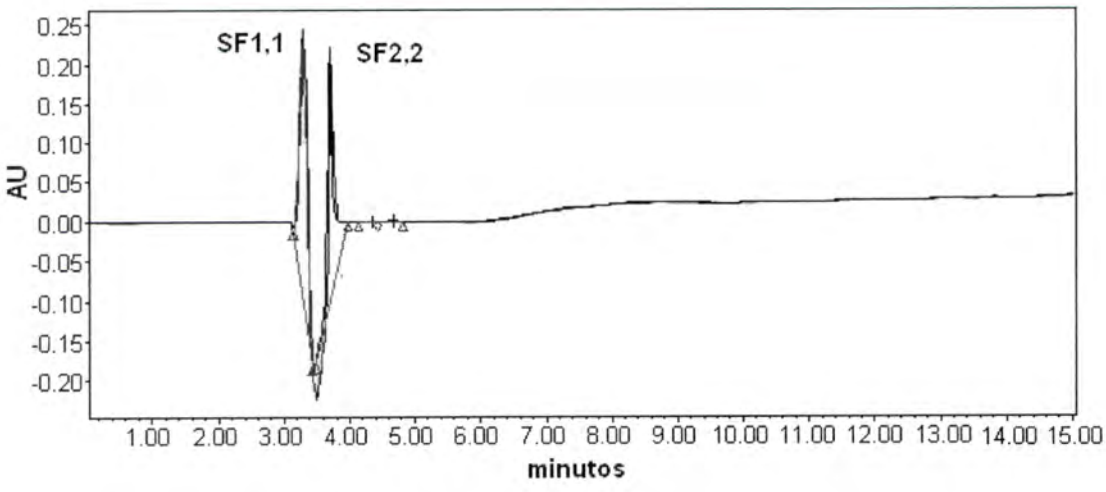


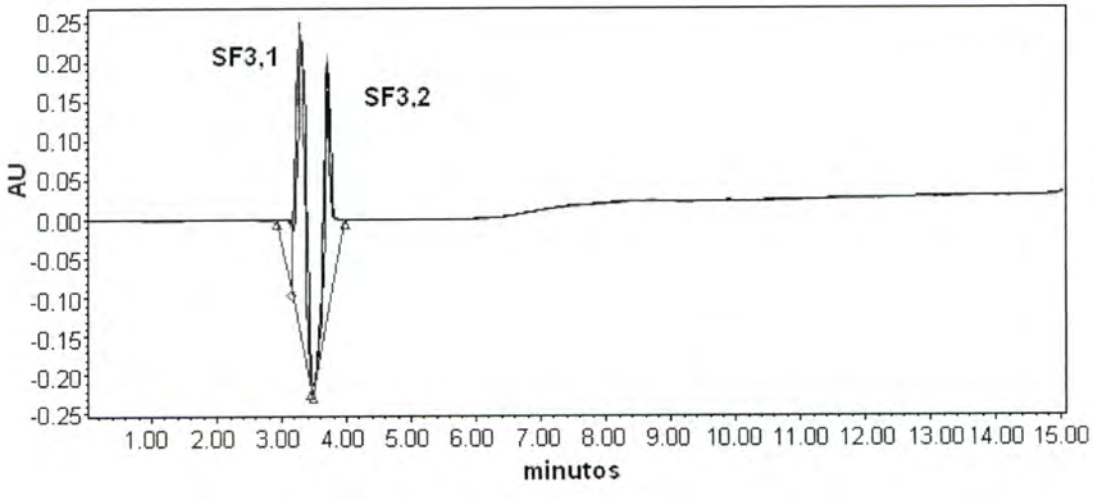
Figura 16. Actividad antihipertensiva normal y especifica de las fracciones 1(11.52 kDa), 3(6.96 kDa) y 5(□1.42 kDa), encontradas en el sobrenadante del producto.

Las fracciones que fueron aisladas por cromatografía de exclusión molecular, también fueron analizadas por RP-HPLC para comprobar si cada fracción estaba constituida por un solo péptido. En la figura 17 se muestran los perfiles para cada una de las fracciones analizadas por RP-HPLC al inicio (aqua) y al final (verde) del almacenamiento, en donde se observa que existe el mismo perfil.

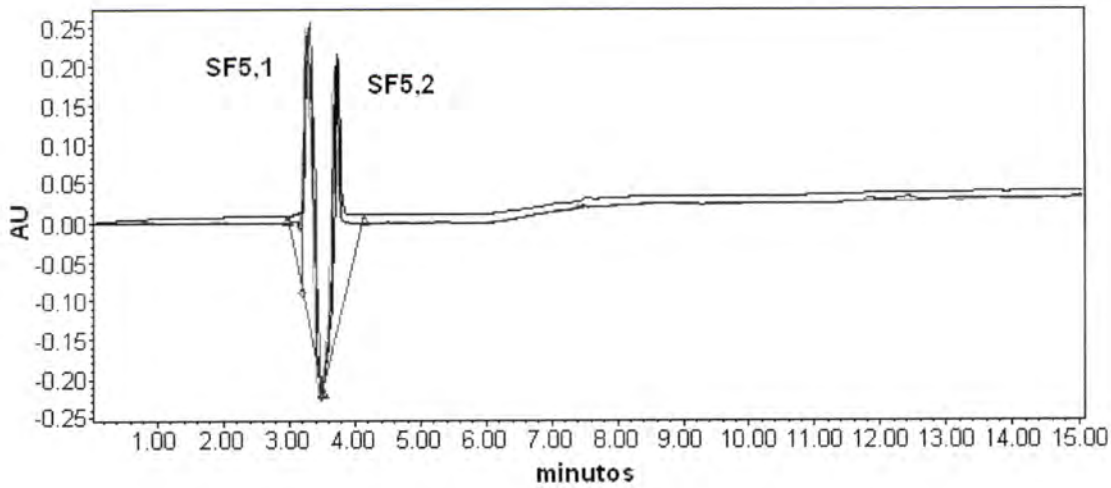
Las fracciones analizadas por RP-HPLC se midieron a 215nm para poder cuantificar, sin embargo, se midieron a otras longitudes de interés son 280 y 257nm debido a que Zola y Horovitz (1981) reportaron que un aminoácido como la fenilalanina, el cual absorbe a 257nm, en la penúltima posición del péptido contribuye a la afinidad con la enzima convertidora de angiotensina I; por otra parte se sabe que los subsitios S_1, S'_1 y S'_2 tienen fuerte afinidad por las cadenas laterales del triptófano, el cual absorbe a 280nm, la alanina y la prolina.



Fracciones de F1 (µg/mL)		
	INICIO	FINAL
$SF_{1,1}$	10.896	10.738
$SF_{2,1}$	9.683	9.375



Fracciones de F3 (µg/mL)		
	INICIO	FINAL
$SF_{3,1}$	14.517	12.331
$SF_{3,2}$	10.746	10.882



Fracciones de F5 (µg/mL)		
	INICIO	FINAL
$SF_{5,1}$	14.989	8.346
$SF_{5,2}$	10.753	10.722

Figura 17. Análisis de las concentraciones de F1, F3 y F5 al inicio y final del almacenamiento por RP-HPLC en una columna C18 (Júpiter 5u 300Å) en 0.1%TFA/Agua como solvente A y 0.1%TFA/ACN:0.1%TFA/Agua (90:10) como solvente B, se empleó un gradiente de B de 20 a 70% con un tiempo de corrida de 30 min, un flujo de 1mL/min, detector de arreglo de diodos y temperatura ambiente

Finalmente se consideró importante para el trabajo calcular el IC_{50} el cual por definición es la cantidad de péptidos en miligramos por mililitro de suero necesaria para inhibir a ACE en un 50%. Para obtener este dato, se tomó el sobrenadante del producto el cual fue liofilizado para posteriormente hacer diluciones a las cuales se les midió la actividad antihipertensiva y la concentración de grupos amino libres, estos datos se graficaron para obtener la ecuación que nos permitió obtener el valor de IC_{50}. El cálculo del IC_{50} (Figura 18) de la ACE con el suero del Sofúl fue de 1.5mg equivalentes de glicina/ mililitro de suero. Este resultado está en el mismo rango de concentración que lo reportado por Leclerc (2002), en donde una leche fermentada con *Lactobacillus helveticus* presentó un IC_{50} para ACE de 0.6-1.1mg/mL de suero. Al comparar este valor con inhibidores

comerciales como el Captopril, que tiene un IC_{50} de $1.30x10^{-3}$mg/mL, (Leclerc y col., 2002) se observa una gran diferencia en concentración necesaria para observar un 50% de inhibición de ACE, sin embargo, la ventaja de los péptidos de la leche es el hecho de no presentar efectos secundarios, además del hecho de que secuencias como Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro tienen un IC_{50} similar al captopril, estas secuencias posen un IC_{50} de $3.13x10^{-3}$mg/mL y $1.81x10^{-3}$ respectivamente por lo que su presencia en las leches fermentadas Evolus y Calpis permite que éstas sean consideradas como medicamentos .

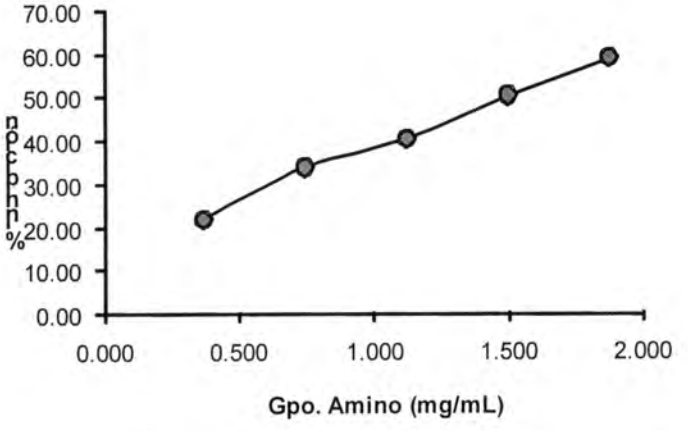


Figura 18. Concentración de grupos amino libres del producto vs. Porcentaje de inhibición de ACE.

En este producto comercial, se encontró un contenido de proteína y de grupos amino libres en el extracto analizado constante durante el periodo de almacenamiento, estos resultados concuerdan con lo obtenido en la electroforesis de péptidos (figura 13) y en los perfiles obtenidos por HPLC (figura 14), todo esto nos indica que el perfil de péptidos producidos durante la fermentación del producto por las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus casei Shirota* (probiotico) y *Streptococcus thermophilus,* se mantiene constante a lo largo del almacenamiento.

Al encontrar una concentración de péptidos constante en el sobrenadante durante el almacenamiento, concuerda con la actividad antihipertensiva del

producto, ya que la proteolisis que llevan a cabo las bacterias ácido lácticas no tiene un efecto significativo sobre la concentración de los péptidos encontrados, razón por la cual la actividad antihipertensiva se mantuviera constante, con un valor promedio de 26.8%, (Fig. 9). Es importante resaltar que la mayoría de los péptidos reportados como antihipertensivos son de bajo peso molecular, lo cual coincide con la fracción F5; sin embargo en la fracción F1 la cual corresponde a un peso molecular de 11.516 kDa también se presentó un efecto antihipertensivo, esto puede deberse a la existencia de un péptido de peso molecular mayor a lo reportado lo cual coincide con lo descrito por Smacchi y Gobbetti (2000) en donde se reportan fracciones peptídicas en el yogurt de hasta 10KDa que presentan actividades biológicas. De ser así, al haber encontrado una fracción (F3) la cual posee uno o más péptidos con un peso molecular de 6.96kDa, valor mayor a lo reportado y que éste a su vez exhibe un porcentaje de inhibición de ACE es muy importante, por lo que sería interesante corroborar que efectivamente se trata de uno o varios péptidos con peso molecular semejante.

Es muy importante resaltar que el tener concentraciones pequeñas de péptidos en el sobrenadante, no implica que la actividad biológica que puedan presentar se vea limitada, Schlimme y Meisel (1995) reportaron que cantidades muy pequeñas de péptidos liberados son suficientes para presentar actividad fisiológica, tal y como se encuentra la fracción F3 de este estudio.

8 Conclusiones

- El sobrenadante del producto lácteo fermentado analizado (Sofúl) presentó una actividad antihipertensiva por medio de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y además dicha actividad permanece constante a lo largo del almacenamiento.

- El sobrenadante del producto lácteo fermentado SOFÚL presentó un contenido de proteína y de grupos amino libres constante a lo largo del almacenamiento, por lo que la proteolisis llevada a cabo por las bacterias ácido lácticas para su crecimiento no afecta significativamente las concentraciones.

- Las electroforesis nativa y SDS-PAGE-Tricina demostraron la presencia de péptidos a lo largo de todo el almacenamiento.

- Los análisis por HPLC por exclusión molecular y RP-HPLC revelaron que el perfil de péptidos del producto durante su vida de anaquel permanece constante.

- Al calcular la actividad antihipertensiva específica de las fracciones analizadas por RP-HPLC se demostró que la fracción F3 presentó la mayor actividad a pesar de estar presente en bajas concentraciones.

- El sobrenadante tiene un valor de IC_{50} de 1.5mg equivalentes a glicina por mL de suero.

9 Perspectivas

Como ya se había mencionado el mercado de los alimentos funcionales sigue en constante crecimiento, debido a que la población cada vez se encuentra más interesada no solo en obtener un producto rico, sino también que éste sea saludable y le aporte efectos benéficos sobre la salud al consumirlo regularmente.

Actualmente los péptidos bioactivos han sido un tema importante de investigación debido a que estos presentan diferente bioactividad dependiendo de la secuencia aminoacida que cada uno posea; sin embargo a pesar de que se cuenta con mucha información acerca del modo de acción de éstos péptidos y se han reportado muchas secuencias con diferentes bioactividades, las cuales provienen de las proteínas de diferentes alimentos, pero especialmente de las proteínas de la leche, hacen falta muchos estudios in vivo para poder establecer bien el efecto de éstos sobre nuestro organismo.

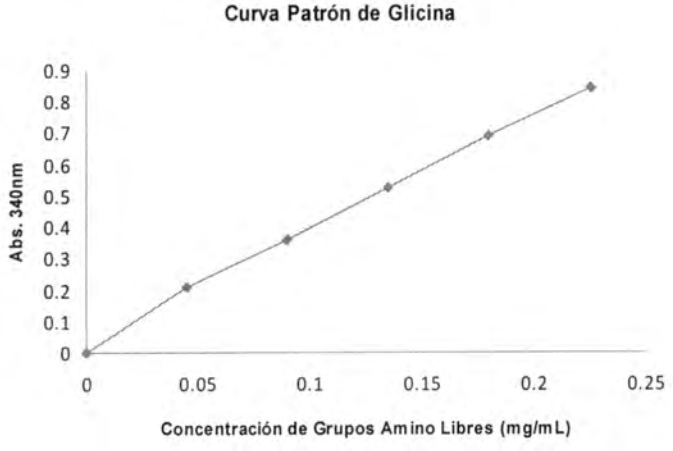
También se sabe que dependiendo del microorganismo fermentador empleado y del tiempo de fermentación, se obtiene un perfil de péptidos diferente, por lo que el producto lácteo fermentado (Sofúl) posiblemente posea péptidos que ya han sido reportados con anterioridad pero también pueden existir péptidos que no se hayan reportado aún y que posean alguna actividad biológica ya que posee un Lactobacilo y un estreptococo con diferentes enzimas.

En este trabajo se investigó la actividad antihipertensiva del producto, pero hacen falta estudios de identificación de éstos péptidos así como un estudio in vivo para ver el efecto antihipertensivo que el producto podría aportar. Además no debemos olvidar que existen otras bioactividades, las cuales, podrían también ser estudiadas en éste producto comercial.

10 Anexos

10.1 Curvas Patrón

10.1.1 Curva Patrón de Glicina 3mM



Curva patrón de Glicina para la determinación de Proteína por el método de TNBS

De esta curva se obtuvo la siguiente ecuación con un R2 de 0.9977:

$$Abs._{340nm} = 3.6918_{[Gpos.a\min o]} + 0.0221$$

10.1.2 Curva Patrón de Seroalbúmina 100-500 µg/mL



Curva patrón de Seroalbúmina para la determinación de Proteína por el método de Lowry

De esta curva se obtuvo la siguiente ecuación con un R2 de 0.988:

$$Abs._{590nm} = 0.001_{[Sero.]} + 0.011$$

11 Bibliografía

Adler-Nissen, J; (1979) DETERMINATION OF THE DEGREE OF HYDROLYSIS OF FOOD PROTEIN HYDROLYSATES BY TRINITROBENZENESULFONIC ACID. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; vol. 27, 6: 1256-1261.

Alais, C; (2001) CIENCIA DE LA LECHE, PRINCIPIOS DE LA TÉCNICA LECHERA. Edit. CECSA, México.

Bruce German, J; Yeretzian, C; Watzke, H; (2004) PERSONALIZING FOODS FOR HEALTH AND PREFERENCE. *Food Technology*, 58: 26-31.

Clare, D; Swaisgood, H; (2000) BIOACTIVE MILK PEPTIDES: A PROSPECTUS. *Journal of Dairy Science*, 83: 1187-1195.

Collins, M; (1999) PROBIOTICS, AND SYNBIOTICS: APPROACHES FOR MODULATING THE MICOBIAL ECOLOGY OF THE GUT. *American Society for Clinical Nutrition*, 69: 1052S-1057S.

Cornelly van der Ven, Gruppen, H; de Bont, D; Voragen, A. (2002) OPTIMISATION OF THE ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME INHIBITION BY WHEY PROTEIN HYDROLYSATES USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY. *International Dairy Journal*, 12: 813-820.

Corona, A; Jiménez, R; (2004) COMPARACION DE DOS METODOS DE SIEMBRA PARA EL RECUENTO DE MICROORGANISMOS EN MUESTRAS CON ALTA CONCENTRACIÓN MICROBIANA. *Revista de la Facultad de Ingeniería Química*, 40:3-7.

Cushman, W; Cheung S; (1970) SPECTROPHOTOMETRIC ASSAY AND PROPERTIES OF THE ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME OF RABBIT LUNG. *Biochemical Pharmacology*, 20: 1637-1648.

Donkor, N; Henriksson, A; Singh, T; Vasiljevic, T; Shah, N; (2007) ACE-INHIBITORY ACTIVITY OF PROBIOTIC YOGHURT. *International Dairy Journal*, 17: 1321-1331.

Elli, M; (1999) GROWTH REQUIREMENTS OF LACTOBACILLUS JOHNSONII IN SKIM AND UHT MILK. *International Dairy Journal*, 9: 507-513.

Fiat, A; Migliore-Samour, D; Jolles, P; (1993) BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES FROM MILK PROTEINS WITH EMPHASIS ON TWO EXAMPLES CONCERNING ANTITHROMBOTIC AND IMMUNOMODULATING ACTIVITIES. *Journal of Dairy Science*, 76: 301-310.

Fox, F; (2001) MILK PROTEINS AS FOOD INGREDIENTS. *Society of Dairy Technology*, 54: 41-55.

Freedman, B; Radda, K; (1968) THE REACTION OF 2,4,6-TRINITROBENZENESULFONIC ACID WITH AMINOACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS. *Biochemistry Journal*, 24: 383-391.

Fitzgerald, R; Murray, B; (2006) BIOACTIVE PEPTIDES AND LACTIC FERMENTATIONS. *International Journal of Dairy Technology*, 59:118-125.

Fuglsang A; Nilsson, D; Nyborg, N; (2002) CARDIOVASCULAR EFFECTS OF FERMENTED MILK CONTEINING ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME INHIBITORS EVALUATED IN PERMANENTLY CATHETERIZED, SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS. Applied and *Environmental Microbiology*, 68.7.3566-3569.

Fuglsang, A: (2003) LACTIC ACID BACTERIA: INHIBITION OF ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME IN VITRO AND IN VIVO. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 83: 27-34.

Garault, P; Letort, C; Juillard, V; Monnet, V; (2000) BRANCHED-CHAIN AMINO ACID BIOSYNTHESIS IS ESSENTIAL FOR OPTIMAL GROWTH OF STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS IN MILK. *American Society for Microbiology*, 5128-5133.

García, M; Quintero, R; López, C; (1993) BIOTECNOLOGIA ALIMENTARIA. Edit. Limusa, México.

García, H; (2000) ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA: FUNDAMENTOS, ACTUALIDAD E IMPORTANCIA. *Laboratorios Beterá*, 31-41.

Garfin, E; (1990) ONE-DIMENSIONAL GEL ELECTROPHORESIS. *Methods in Enzymology*, 182: 425-441.

Gerdes, K; Harper, J; Millar, G; (2001) BIOACTIVE COMPONENTS OF WHEY AND CARDIOVASCULAR HEALTH. *U.S Dairy Export Council* (USDEC) www.usdec.org

Gill, S; Doull, F; Rutherfurd, J; Cross L; (2000) IMMUNOREGULATORY PEPTIDES IN BOVINE MILK. *British Journal of Nutrition*, 84: S111-S117.

Goodwin, F; Siu-Ying, C; (1970) QUANTIFICATION OF PROTEIN SOLUTIONS WITH TRINITROBENZENESULFONIC ACID. *Clinical Chemistry*, 16: 24-31.

Groziak, M; (2000) NATURAL BIOACTIVE SUBSTANCES IN MILK AND COLOSTRUM: EFFECTS ON THE ARTERIAL BLOOD PRESSURE SYSTEM. *British Journal of Nutrition*, 84: S119-S125.

Guan-Hong, L; Huan, L; Yong-Hui, S; Guo-Wei, L; (2005) DIRECT SPECTROPHOTOMETRIC MEASUREMENT OF ANGIOTENSIN I-CONVERTING ENZYME INHIBITORY ACTIVITY FOR SCREENING BIOACTIVE PEPTIDES. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37: 219-224.

Guédon, E; Renault, P; Ehrlich, D; Delorme C; (2001) TRANSCRIPTIONAL PATTERN OF GENES CODING FOR THE PROTEOLYTIC SYSTEM OF *LACTOCOCCUS LACTIS* AND EVIDENCE FOR COORDINATED REGULATION OF KEY ENZYMES BY PEPTIDE SUPPLY. *Journal of Bacteriology*, 183:3614-3622.

Guédon, E; Serror, P; Ehrlich, D; Renault, P; Delorme C; (2001) PLEIOTROPIC TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR CODY SENSES THE INTRACELLULAR POOL OF BRANCHED-CHAIN AMINO ACIDS IN *LACTOCOCCUS LACTIS*. *Molecular Microbiology*, 40:1227-1239.

Harris, D. C. ANÁLISIS QUÍMICO CUANTITATIVO. Grupo Edit. Reverte; 5ª ed. México; 2001.

Hartmann, R; Meisel, H; (2007) FOOD-DERIVED PEPTIDES WITH BIOLOGICAL ACTIVITY: FROM RESEARCH TO FOOD APPLICATIONS. *Current Opinión in Biotechnology*, 18:163-169.

Hebert, E; Raya R; De Giori, G; (2000) NUTRITIONAL REQUIREMENTS AND NITROGEN-DEPENDENT REGULATION OF PROTEINASE ACTIVITY OF *LACTOBACILLUS HELVETICUS* CRL 1062. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:5316-5321.

Hernández-Ledesma, B; Miralles, B; Amigo, L; Ramos, M; Recio, I; (2005) IDENTIFICATION OF ANTIOXIDANT AND ACE-INHIBITORY PEPTIDES IN FERMENTED MILK. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85:1041-1048.

Holzapfel, W; Heberer, P; Geisen, R; Björkroth, J; Schillinger, U; (2001) TAXONOMY AND IMPORTANT FEATURES OF PROBIOTIC MICROORGANISMS IN FOOD AND NUTRITION. *American Society for Clinical Nutrition*, 73: 365S-373S.

Hosono, A; (2002) IMPACT OF FERMENTED MILK ON HUMAN HEALTH: CHOLESTEROL-LOWERING AND IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF FERMENTED MILK. *Animal Science Journal*, 73: 241-256.

Israili, H; Hernández-Hernández, R; Valasco, M.; (2007) THE FUTURE OF ANTIHYPERTENSIVE TREATMENT. Department of Medicine, Emory University School of Medicine, Atlanta, *American Journal Therapy*. 14(2):121-34.

Jauhiainen, T; Korpela, R; (2007) MILK PEPTIDES AND BLOOD PRESSURE. *The Journal of Nutrition*, 137:825S-829S.

Jay, M; (2000) MODERN FOOD MICROBIOLOGY. 6th edition, an Aspen Publication; pag. 113-130.

Jiménez, J; Baró, L; Martínez, A; Bouza, J; (2001) BIOACTIVE MILK PEPTIDES AND PROTEINS. *Ars Pharmaceutica*, 42: 135-145.

Kitts, D; Yuan Y; (1992) CASEINOPHOSPHOPEPTIDES AND CALCIUM BIOAVAILABILITY. *Trenes in Food Science & Technology*, 3: 31-34.

Korhonen, H; Pihlanto, A; (2006) BIOACTIVE PEPTIDES:PRODUCTION AND FUNCTIONALITY. *International Dairy Journal*, 16:945-960.

Kunji, E; Mierau, I; Hagting, A; Poolman, B; Konings W; (1996) THE PROTEOLYTIC SYSTEM OF LACTIC ACID BACTERIA. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 187-221.

Leclerc, L; Gauthier, F; Bachelard, H; Santure, M; (2002) ANTIHYPERTENSIVE ACTIVITY OF CASEIN-ENRICHED MILK FERMENTED BY *LACTOBACILLUS HELVETICUS*. *International Dairy Journal*, 12: 995-1004.

Ledesma, B; Amigo, L; Ramos, M; Recio, I; (2004) ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME INHIBITORY ACTIVITY IN COMERCIAL FERMENTED PRODUCTS. FORMATION OF PEPTIDES UNDER SIMULATED GASTROINTESTINAL DIGESTION. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 1504-1510.

Letort, C; (2002) CASEIN UTILIZATION BY STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS RESULTS IN A DIAUXIC GROWTH IN MILK. *Applied and Environmental Microbiology*, 3162-3165.

López-Fandiño, R; Otte, J; van Camp, J; (2006) PHYSIOLOGICAL, CHEMICAL AND TECHNOLOGICAL ASPECTS OF MILK-PROTEIN-DERIVED

PEPTIDES WITH ANTIHYPERTENSIVE AND ACE-INHIBITORY ACTIVITY. *International Dairy Journal*, 16: 1277-1293.

Lowry, H; Rosebrough, N; Farr, A; Randall, J; (1951) PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *The Journal of Biological Chemistry*, 1951, 265-275.

Maeno, M; Yamamoto, N; Takano, T; (1996) IDENTIFICATION OF AN ANTIHYPERTENSIVE PEPTIDE FROM CASEIN HYDROLYSATES PRODUCED BY PROTEINASE FROM LACTOBACILLUS HELVETICUS CP790. *Journal of Dairy Science*, 79:1316-1321.

Maier, G; (1982) METODOS MODERNOS DE ANALISIS DE ALIMENTOS; Edit. Acribia.

Meisel, H; (1997) BIOCHEMICAL PROPERTIES OF BIOACTIVE PEPTIDES DERIVED FROM MILK PROTEINS: POTENTIAL NUTRACEUTICALS FOR FOOD AND PHARMACEUTICAL APPLICATIONS. *Livestock Production Science SO*; 125-138.

Meisel, H; Bockelmann, W; (1999) BIOACTIVE PEPTIDES ENCRYPTED IN MILK PROTEINS: PROTEOLYTIC ACTIVATION AND THROPHO-FUNCTIONAL PROPERTIES. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 207-215.

Meisel, H; FitzGerald, J; (2000) OPIOID PEPTIDES ENCRYPTED IN INTACT MILK PROTEIN SEQUENCES. *British Journal of Nutrition*, 84: S27-S31.

Meisel, H; (2001) BIOACTIVE PEPTIDES FROM MILK PROTEINS: A PERSPECTIVE FOR CONSUMERS AND PRODUCERS. *Australian Journal of Dairy Technology*, 56:83-92.

Meisel, H; (2005) BIOCHEMICAL PROPIERTIES OF PEPTIDES ENCRYPTED IN BOVINE MILK PROTEINS. *Current Medicinal Chemistry*, 12: 1905-1919.

Nighswonger, B; Brashears, M; Guilliland, S; (1996) VIABILITY OF LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS AND LACTOBACILLUS CASEI IN FERMENTED MILK PRODUCTS DURING REFRIGERATED STORAGE. *Journal of Dairy Science*, 79: 212-219.

Nikbin, M; (2000) IMMUNOLOGICAL EFFECTS OF YOGURT. *Journal Clinic Nutrition*, 71: 861-872.

Otte, J; Shalaby, S; Zakora, M; Pripp, A; El-Shabrawy, S; (2007) ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME INHIBITORY ACTIVITY OF MILK PROTEIN HYDROLYSATES: EFFECT OF SUSTRATE, ENZYME AND TIME OF HYDROLYSIS. *Interntional Dairy Journal*, 17: 488-503.

Otte, J; Shalaby, S; Zakora, M; Nielsen, M; (2007) FRACTIONATION AND IDENTIFICATION OF ACE-INHIBITORY PEPTIDES FROM A-LACTALBUMIN AND B-CASEIN PRODUCED BY THERMOLYSIN-CATALYSED HYDROLYSIS. *International Dairy Journal*, 17: 1460-1472.

Perpetuo, A; Juliano, L; Lebrun, I; (2003) BIOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS OF TWO BRADYKININ-POTENTIATING PEPTIDES OBTAINED FROM TRYPTIC HYDROLYSIS OF CASEIN. *Journal of Protein Chemistry*, 22: 601-606.

Petranovic, D; Guédon, E; Sperandio, B; Delorme, C; Ehrlich, D; Renault, P. (2004) INTRACELLULAR EFFECTORS REGULATING THE ACTIVITY OF THE *LACTOCOCCUS LACTIS* CODY PLEIOTROPICTRANSCRIPTION REGULATOR. *Molecular Microbiology*, 53:613-621.

Rajagopal, S; Sandine, W; (1990) ASSOCIATIVE GROWTH AND PROTEOLYSIS OF STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS AND LACTOBACILLUS BULGARICUS IN SKIM MILK. *Journal Dairy Science*, 73: 894-899.

Rokka, T; Syvaoja, E; Tuominen, J; Coronen, H; (1997) RELEASE OF BIOACTIVE PEPTIDES BY ENZYMATIC PROTEOLYSIS OF BACILLU GG FERMENTED UHT MILK. *Milchwissenschaft,* 52: 675-677.

Sanders, E; (2000) CONSIDERATIONS FOR USE OF PROBIOTIC BACTERIA TO MODULATE HUMAN HEALTH. *American Society for Nutritonal Sciences*, 384-390.

Santos, A; (1987) LECHE Y SUS DERIVADOS. Edit. Trillas, 1ª ed; México. (5ª reimpresión).

Sasaki, M; (1995) IMMUNOLOGICAL AND ELECTROPHORETIC STUDY OF THE PROTEOLYTIC ENZYMES FROM VARIOUS LACTOCOCCUS AND LACTOBACILLUS STRAINS. *Journal of Dairy Research*, 62: 611-620.

Savijoki, K; (2006) PROTEOLITIC SYSTEM OF LACTIC ACID BACTERIA. *Applied Microbiology Biotechnology*, 71: 394-406.

Schägger, H; von Jagow, G; (1987) TRICINE-SODIUM DODECYL SULFATE-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS FOR THE SEPARATION OF PROTEINS IN THE RANGE FROM 1 TO 100 KDa. *Analytical Biochemistry*, 166: 368-379.

Schanbacher, L; Talhouk, S; Murria, A; (1997) BIOLOGY AND ORIGIN OF BIOACTIVE PEPTIDES IN MILK. *Livestock Production Science SO*; 105-123.

Schlimme, E; Meisel, H; (1995) BIOACTIVE PEPTIDES DERIVED FROM MILK PROTEINS: STRUCTURAL PHYSIOLOGICAL AND ANALYTICAL ASPECTS. Die Nahrung 39:1-20.

Shah, N; (2000) PROBIOTIC BACTERIA: SELECTIVE ENUMERATION AND SURVIVAL IN DAIRY FOODS. *Journal of Dairy Science*, 83: 894-907.

Shah, N; (2001) FUNCTIONAL FOODS FROM PROBIOTICS AND PREBIOTICS. *Food Technology*, 55: 46-53.

Shalaby, S; Zakora, M; Otte, J; (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.

Shihata, A; Shah, N; (2000) PROTEOLYTIC PROFILES OF YOGURT AND PROBIOTIC BACTERIA. *International Dairy Journal*, 10: 401-408.

Skoog, D. A. y West, D. M. QUÍMICA ANALÍTICA. Edit. Reverte; España; 1979.

Smacchi, E; Gobbetti, M; (2000) BIOACTIVE PEPTIDES IN DAIRY PRODUCTS: SYNTHESIS AND INTERACTION WITH PROTEOLYTIC ENZYMES. *Food Microbiology*, 17:129-141.

Soomro, A; Masud, T; Anwaar, K; (2002) ROLE OF LACTIC ACID BACERIA (LAB) IN FOOD PRESERVATION AND HUMAN HEALTH – A REVIEW. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1: 20-24.

Sindayikengera, S; and Wenshui, X; (2005) MILK BIOLOGICALLY ACTIVE COMPONENTS AS NUTRACEUTICALS: REVIEW. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45:645-656.

Takano, T; (2002) ANTI-HYPERTENSIVE ACTIVITY OF FERMENTED DAIRY PRODUCTS CONTAINING BIOGENIC PEPTIDES. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82: 333-340.

The handbook of Analysis and Purification of Peptides and Proteins by Reversed-Phase HPLC, GRACE VYDAC; 3rd edition, 2002.

Torres, M; Vallejo, B; González, F; (2005) PEPTIDOS BIOACTIVOS DERIVADOS DE LAS PROTEINAS DE LA LECHE. ALAN (Archivos Latinoamericanos de Nutrición) V. 55, No. 2.

Vinderola, G; Mocchiutti, P; Reinheimer, J; (2002) INTERACTIONS AMONG LACTIC ACID STARTER AND PROBIOTIC BACTERIA USED FOR FERMENTED DAIRY PRODUCTS. *Journal of Dairy Science*, 85: 721-729.

Vioque, J; Millán, F; (2005) LOS PEPTIDOS BIOACTIVOS EN ALIMENTACION: NUEVOS AGENTES PROMOTORES DE SALUD. *CTC-Alimentación*, 26: 103-107.

Wen-Hsin, L; Chin-Fa, H; Li-Wei, C; Hau-Yang, T; (2006) VIABLE COUNTS, CHARACTERISTICS EVALUATION FOR COMMERCIAL LACTIC BACTERIA PRODUCTS. *Food Microbiology*, 23: 74-81.

Yakult Central Institute for Microbiological Research, (1999) *Lactobacillus casei strain Shirota* "Intestinal Flora and Human Health". Yakult HONSHA CO. LTD.

Yamamoto, N; Maeno, M; Takano, T; (1999) PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AN ANTIHIPERTENSIVE PEPTIDE FROM A YOGURT-LIKE PRODUCT FERMENTED BY *LACTOBACILLUS HELVETICUS CPN4. Journal of Dairy Science*, 82:1388-1393.

Yamamoto, N; (2003) BIOGENIC PEPTIDES AND THEIR POTENTIAL USE. Current Pharmaceutical Design, 1345-1355.

Yoshikawa, M; Tani, T; Ashikaga, T; Yoshimura; Chiba, H; (1986) PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AN OPIOID ANTAGONIST FROM A PEPTIDE DIGEST OF BOVINE K-CASEIN. *Agriculture Biological. Chemistry*, 50:2951-2954.

Zola P. y Horovitz, Ph. D.; (1981), ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME INHIBITORS, MECHANISMS OF ACTION AND CLINICAL IMPLICATIONS, Urban & Schwarzenberg Baltimore-Munich.