



**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**

**IZTAPALAPA**

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

**Efecto del pH sobre el perfil de péptidos potencialmente  
bioactivos producidos por *Lactococcus lactis* subsp.  
*cremoris* NCFB 712**

**T E S I S**

**para obtener el grado de  
Doctor en Biotecnología**

**P R E S E N T A:**

**M. en B. Claudia Yuritzí Figueroa Hernández**

**DIRECTORA:**

**Dra. Judith Jiménez Guzmán**

México D.F. 26 de julio de 2012

**“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”**

México D.F. a 26 de julio del 2012

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

Efecto del pH sobre el perfil de péptidos potencialmente bioactivos  
producidos por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712

que presentó

M. en B. Claudia Yuritzi Figueroa Hernández

**Comité Tutorial:**

Director: Dra. Judith Jiménez Guzmán

Asesor: Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Asesor: Dr. Miquel Gimeno Seco

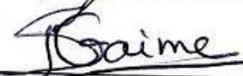
**Jurado:**

Presidente: Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Secretario Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano

Vocal: Dra. Ivonne Figueroa González

Vocal: Dra. Isabelle Gaime Perraud

  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS:**

A mi directora, la **Dra. Judith Jimenez Guzmán**: a quien agradezco el apoyo brindado

A mi asesora, la **Dra. Alma Cruz Guerrero**: a quien agradezco todo el tiempo atención, comprensión, consejos y apoyo brindando en la realización de este trabajo. Realmente la admiro como profesional y por su gran calidez humana. Muchas gracias por todo.

A la **Dra. Gabriela Rodríguez Serrano**: a quien agradezco todo el apoyo consejos y sugerencias las cuales sirvieron para enriquecer a este proyecto. Fue un placer trabajar con usted.

A la **Dra Isabelle Gaimé Perraud**: A quien agradezco el apoyo y consejos brindados para el enriquecimiento de este trabajo.

A la **M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz**: a quien agradezco el apoyo en tiempos difíciles además de los valiosos consejos que me han servido no sólo en la realización de esta tesis sino también en la vida. Además de su gran calidez humana, ya sabe que la quiero mucho, es como una segunda madre.

A la **Dra. Ivonne Figueroa González**: a quien agradezco todos los consejos, sugerencias, tiempo y comprensión brindados. Además de que tengo la fortuna de tenerte como amiga. Gracias por todo lo que has hecho por mí. Ya sabes que te quiero como una hermana.

Al **Dr. Mariano García Garibay**: a quien agradezco los consejos y sugerencias brindadas para el enriquecimiento de este proyecto.

Al **Dr. Gerardo Ramírez Romero**: Por todo el apoyo, comprensión, paciencia y confianza que me ha brindado desde que fui su alumna de servicio social. No tengo palabras para agradecerle todo lo que ha hecho por mí.

Al Dr. **Francisco J. Fernández Perrino** y A la **Dra. Clara Pelayo** por todo el apoyo brindado en los tiempos difíciles, sus sabios consejos, los cuales me han ayudado en el plano profesional y personal, además de su gran disposición y calidez humana.

A la **Dra. Lourdes Yañez López**: a quien agradezco todos los consejos y el apoyo brindado. También le agradezco su amistad y el compartir su experiencia conmigo.

A la **M. en B. Rebeca Rojas Ronquillo** y a la **M. en B. Karina Domínguez González** por todo el apoyo brindado en la realización de algunas de las técnicas empleadas en la realización de este trabajo además de su amistad, las quiero mucho chicas.

## **DEDICATORIAS:**

Este trabajo está dedicado a la memoria de mi abuelo **Guillermo**, quien fue el que me inspiro con su ejemplo a luchar por sus ideales. Gracias por todos los momentos y enseñanzas que me brindaste.

**A mis padres:** quienes me han apoyado incondicionalmente, gracias por su entrega y confianza, al fin lo logramos, los quiero mucho.

**A mis Abuelitas:** por su cariño y comprensión, las quiero mucho.

**A mi familia:** pero especialmente a la familia Dávila- Figueroa y Hernández- Chávez, sin su apoyo no hubiera sido posible, son lo que me impulsa a seguir adelante.

**A mis amigos:**

**Ivonne:** Gracias por brindarme tu incondicional amistad, ya sabes que te quiero como una hermana y aunque no te encuentres cerca se que estás conmigo.

**A la familia Figueroa-González** por brindarme su apoyo. Muchísimas gracias a todos. Los quiero mucho.

**Miriam, Jannis, Nohemi y Ara:** Gracias por su invaluable amistad, ya saben que también son como mis hermanas, además que esta amistad a logrado perdurar desde la vocacional hasta el presente.

**Francisco y Edvard:** Mis queridos amigos gracias por todas esas grandísimas experiencias que he vivido con ustedes, además de la gran confianza que me han brindando ustedes y sus familias.

**Omar:** gracias por todos los momentos y experiencias que hemos vivido, las cuales han servido para enriquecer nuestra amistad, ya sabes que te quiero mucho. También he tenido la oportunidad de conocer a tu familia a quienes quiero mucho.

**Sra. Rocío** ya sabe que la quiero mucho, gracias por brindarme su apoyo y comprensión.

**Ofelia y Alejandra:** Por todas las experiencias y momentos vividos. Gracias por su amistad.

**Olivia, Frank, Yola, Angie, Becky, Nataly, Oscar, Omar, Luis, Diana, Miguel, Erick, Naye, Julio, Viris, Deni, Ruth, Hiran:** Quienes me han brindado su amistad incondicional y momentos increíbles.

Give me a sign  
Give me a reason to hold on  
I'm holding on  
What is a life  
A series of moments all in a line  
Just passing by  
And so I lay here awake  
As all the clouds fall away  
Then fast asleep in your arms  
Wake up wonder where we are  
Try to freeze frame the day  
Then the light starts to fade  
I will scream at the sky  
'Til we drink the oceans dry  
And so we run  
Over the bridge  
Back to the place where we were young  
What we could have done  
What did you find  
Here we are naked under God  
Lucky God is blind  
And so I lay here awake  
As all the clouds fall away  
Then fast asleep in your arms  
Wake up wonder where we are  
Try to freeze frame the day  
Then the light starts to fade  
I will scream at the sky  
'Til we drink the oceans dry  
And so we run  
And so we run

**D. Usher**

## **Índice**

Resumen	6
Abstract	7
1. Introducción	8
2. Antecedentes	10
2.1. Composición de la leche	10
2.2. La leche como alimento funcional	10
2.2.1. Caseínas	12
2.2.2. Proteínas del suero lácteo	12
2.3. Péptidos bioactivos	13
2.3.1. Péptidos antimicrobianos	14
2.3.2. Péptidos antitrombóticos	15
2.3.3. Péptidos inmunomoduladores	16
2.3.4. Péptidos fijadores de minerales	16
2.3.5. Péptidos opioides	17
2.3.6 Péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE)	17
2.4. Medios de producción y separación de los péptidos bioactivos	20
2.4.1. Producción de péptidos por hidrólisis enzimática	20
2.4.2. Producción de péptidos por fermentación microbiana	21
2.4.2.1. Péptidos inhibidores de la ACE producidos por fermentación	22
2.4.3.2. Péptidos fijadores de minerales producidos por fermentación	24
2.5. Sistema Proteolítico de <i>Lactococcus lactis</i>	24
2.5.1. Proteinasas	25
2.5.2. Sistemas de transporte de Aminoácidos y Péptidos	27
2.5.3. Peptidasas	28
2.6. Género <i>Lactococcus</i>	28
2.6.1. <i>Lactococcus lactis</i>	29
2.6.2. Importancia industrial de <i>Lactococcus lactis</i>	29
3. Justificación	31
4. Objetivos	32
4.1. Objetivo general	32
4.2. Objetivos particulares	32

**Efecto del pH sobre el perfil de péptidos potencialmente bioactivos producidos  
por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712**

---

5. Hipótesis	33
6. Metodología	34
6.1. Conservación y acondicionamiento del microorganismo	34
6.2. Preparación de la leche para la fermentación	35
6.3. Fermentación	35
6.4. Crecimiento Microbiano	37
6.5. Determinación de grupos amino libres por el método del ácido trinitrobenzensulfónico (TNBS)	38
6.6. Grado de inhibición de la ACE	39
6.7. Determinación del IC <sub>50</sub>	40
6.8. Prueba de estabilidad a las enzimas digestivas	40
6.9. Determinación de fijación de hierro	41
6.10. Determinación de fijación de calcio	42
6.11. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	43
6.11.1 Cromatografía de exclusión	43
6.11.2. HPLC en fase reversa	43
6.12. Análisis estadístico	44
7. Resultados y discusión	46
7.1. Determinación de crecimiento microbiano y monitoreo del pH durante las fermentaciones	46
7.2. Generación de grupos amino libres durante las fermentaciones	47
7.3. Perfil de péptidos obtenidos por cromatografía de exclusión molecular	48
7.4. Grado de inhibición de la ACE en las fermentaciones	54
7.5. Determinación del IC <sub>50</sub> de los péptidos generados por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCFB 712	59
7.6. Determinación del grado de fijación del hierro	61
7.7. Determinación del grado de fijación de Calcio	63
7.8. Estabilidad a las enzimas digestivas	68
7.9. Fraccionamiento del digerido del sobrenadante de 32 h. de la fermentación sin control de pH	70
8. Conclusiones	74
9. Anexos	76
9.1. Figura de la curva para la determinación de la concentración de los péptidos	

encontrados por HPLC	76
9.2. Figura de la curva para la determinación del peso molecular de los péptidos encontrados por HPLC	76
9.3. Figuras realizadas para la determinación del IC <sub>50</sub> de las fermentaciones	77
9.4. Figura de la curva patrón de calcio	79
10. Bibliografía	80

### **Índice de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Componentes bioactivos de la leche de vaca	11
<b>Tabla 2.</b> Contribución de <i>Lactococcus lactis</i> al sabor, aroma, textura y conservación en los productos lácteos fermentados	30
<b>Tabla 3.</b> Gradiente utilizado para la cromatografía en fase reversa	44
<b>Tabla 4.</b> Pesos moleculares de los péptidos menores a 10 kDa presentes en las leches fermentadas (con y sin control de pH) con <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCFB 712 encontrados durante las fermentaciones	53
<b>Tabla 5.</b> Comparación de los péptidos encontrados en las fermentaciones con <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCFB 712 con los péptidos inhibidores de la ACE reportados péptidos inhibidores de la ACE	56
<b>Tabla 6.</b> Valores del IC <sub>50</sub> de los sobrenadantes de las fermentaciones de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCFB 712	60
<b>Tabla 7.</b> Comparación de los péptidos encontrados en las fermentaciones con <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCFB 712 que coinciden con péptidos acarreadores de minerales reportados	65
<b>Tabla 8.</b> Pesos moleculares de los péptidos antes y después de la digestión con tripsina y pepsina	70

### **Índice de figuras**

<b>Figura 1.</b> Función de la ACE en el Sistema Renina –Angiotensina	18
<b>Figura 2.</b> Sistema proteolítico de <i>Lactococcus lactis</i>	25
<b>Figura 3.</b> Especificidad de la CEP <sub>I</sub> y CEP <sub>III</sub> de <i>Lactococcus lactis</i> sobre la $\alpha_{s1}$ -CN (1-23)	27
<b>Figura 4.</b> Sistemas de Transporte de péptidos en <i>Lactococcus lactis</i>	28

<b>Figura 5.</b> Propagación de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCFB 712	34
<b>Figura 6.</b> Metodología empleada para realización de las fermentaciones	36
<b>Figura 7.</b> Metodología de los análisis realizados a las muestras de las fermentaciones	37
<b>Figura 8.</b> Reacción del TNBS con los grupos aminos terminales	38
<b>Figura 9.</b> Reacción catalizada por la ACE, según el método de Cushman y Cheung	39
<b>Figura 10.</b> Crecimiento y evolución del pH durante las fermentaciones de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCFB 712	47
<b>Figura 11.</b> Concentración de grupos amino libres y crecimiento durante las fermentaciones de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCFB 712	48
<b>Figura 12.</b> Concentración de péptidos menores a 10 kDa en las fermentaciones de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCFB 712	49
<b>Figura 13.</b> Cromatogramas (a 215 nm) de las muestras obtenidas a las 8 h de fermentación de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCFB 712, con y sin control de pH	50
<b>Figura 14.</b> Cromatogramas (a 215 nm) de las muestras obtenidas a las 32 h de fermentación de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCFB 712, con y sin control de pH	51
<b>Figura 15.</b> Inhibición de la ACE (%) durante las fermentaciones de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCFB 712, con y sin control de pH	54
<b>Figura 16.</b> Correlación entre la actividad proteolítica y el % de inhibición de la ACE en las fermentaciones de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCFB 712, con y sin control de pH	58
<b>Figura 17.</b> Determinación del IC <sub>50</sub> del sobrenadante obtenido a las 28 h. de fermentación con control de pH de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCFB 712	59
<b>Figura 18.</b> Porcentaje de hierro fijado en las fermentaciones con y sin control de pH realizadas con <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCFB 712	61
<b>Figura 19.</b> Concentración de Calcio fijado en las fermentaciones con y sin control de pH realizadas con <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCFB 712	64

<b>Figura 20.</b> Correlación de la actividad proteolítica con la concentración de Calcio fijado ( $\mu\text{g}$ de $\text{Ca}^{2+}/\text{mL}$ ) de los sobrenadantes de la fermentación con control de pH realizada con <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCFB 712	67
<b>Figura 21.</b> Correlación de la actividad proteolítica con la concentración de Calcio fijado ( $\mu\text{g}$ de $\text{Ca}^{2+}/\text{mL}$ ) de los sobrenadantes de la fermentación sin control de pH realizada con <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCFB 712	68
<b>Figura 22.</b> Estabilidad frente a la acción de la tripsina y la pepsina de los sobrenadantes obtenidos a 32 h de fermentación	69
<b>Figura 23.</b> Actividad inhibidora de la ACE de las fracciones del digerido del tiempo 32 de la fermentación sin control de pH de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCFB 712	71
<b>Figura 24.</b> Cromatograma de la fracción peptídica de 0.58 KDa (fracción 7) en fase reversa	72
<b>Figura 25.</b> Actividad inhibidora de la ACE/ $\mu\text{g}$ de los péptidos encontrados en las fracciones peptídicas de 1.14, .0.58 y 0.28 kDa (fracciones 6, 7 y 8)	73

## **Resumen**

Los péptidos derivados de las proteínas de la leche pueden ejercer funciones fisiológicas en el cuerpo humano, una de las actividades más estudiadas es la actividad antihipertensiva, la cual se ejerce por medio de la inhibición de la enzima convertidora de Angiotensina (ACE). Estos péptidos pueden ser liberados a partir de las proteínas precursoras durante la fermentación con microorganismos proteolíticos. En este trabajo se estudió el efecto del pH en la producción de péptidos bioactivos durante la fermentación de la leche con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712.

La actividad proteolítica (medida por TNBS) fue mayor en las fermentaciones con control de pH (pH 6.2) aunque no se observó una mayor concentración de péptidos menores a 10 k Da con respecto a la fermentación sin control de pH. Los perfiles peptídicos en las fermentaciones con y sin control de pH, muestran diferencias a partir de la octava hora de fermentación, por lo que se piensa que esta diferencia en los perfiles peptídicos se debe principalmente al efecto de pH sobre la especificidad y la actividad proteolítica de la proteinasa ligada a pared celular tipo 1 (CEP-I), de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 que le permite crecer en la leche. La fermentación sin control de pH mostró tener un mayor porcentaje de actividad inhibidora de la ACE y por lo tanto un valor menor de IC<sub>50</sub> y una mayor potencia inhibidora de la ACE. Sin embargo al llevar a cabo la simulación del proceso de digestión gastrointestinal (con pepsina y tripsina) la actividad inhibidora de la ACE de esta fermentación presentó una disminución de 14% mientras que las muestras de la fermentación con control de pH mantuvieron su actividad inhibidora de la ACE después de la digestión. La fracción peptídica con mayor actividad inhibidora de la ACE tuvo un peso molecular de 0.58 kDa (determinada por HPLC), lo cual coincide con lo reportado previamente, ya que la mayoría de los péptidos inhibidores de la ACE tienen pesos moleculares menores a un 1 kDa. Esta fracción se purificó por medio de cromatografía en fase reversa (RP-HPLC), donde se encontraron tres fracciones peptídicas con una alta actividad inhibidora de la ACE.

Con respecto a la fijación de minerales, se observó que los péptidos de la fermentación con control de pH presentaron una mayor habilidad para fijar el calcio y el hierro que los péptidos obtenidos en la fermentación sin control de pH

## **Abstract**

Milk protein derived peptides could exert physiology functions in human body, mainly antihypertensive activity by the inhibition of the Angiotensin Converting Enzyme (ACE). These peptides can be liberated by proteolytic microorganism during fermentation. In this work the effect of pH on the production of bioactive peptides during milk fermentation by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 was studied. The proteolytic activity (measured by TNBS) was higher in the fermentations with pH control (pH 6.2) than in the fermentations without control even it was not observed higher concentrations of peptides of less than 10 k Da compared to the fermentation without pH control. The peptide profiles in both fermentations showed differences since the eighth hour of fermentation, when the pH value of the fermentations began to show statistical significance. It is thought that these differences in peptide profiles are mainly due to effect of pH on both proteolytic activity and specificity of cell wall proteinase type 1 (CEP-I), that is the type of enzyme that has the microorganism used for supported their growth in milk.

The fermentation without pH control has a higher percent of ACE-inhibitory activity and a lower IC<sub>50</sub> value, therefore has higher ACE- inhibitory potency. However when carry out the simulation of gastrointestinal digestion (with pepsin and trypsin) the ACE-inhibitory activity of this hydrolysates decreased in 14%, while the fermentations with pH control keep their ACE-inhibitory activity after an enzymatic digestion. The peptide fraction with higher ACE-inhibitory activity has a having a molecular weight determinate by exclusion HPLC close to 0.58 kDa which is very important because the majority of the peptides with ACE-inhibitory activity have molecular weights less than 1 kDa. This fraction was re-fractionated by RP- HPLC finding 4 sub-fractions; three of them showed high ACE- inhibitory activity and one a higher concentration than the others.

With respect to the binding of minerals was observed that the pH-controlled fermentation has the ability to bind iron and calcium while the samples from the fermentation without pH control only have the ability to bind calcium in a lower concentration than in fermentations with pH control.

## **1. Introducción**

En los últimos 10 años se han estudiado ampliamente los péptidos bioactivos derivados de las proteínas alimentarias. Las proteínas de la leche son una de las fuentes principales en donde se encuentran encriptados estos péptidos. Los péptidos bioactivos pueden tener diversas actividades en el cuerpo como la antimicrobiana, la inmunomoduladora, la antihipertensiva, la opioide y la fijadora de minerales. De todas estas actividades, las más estudiadas debido a los beneficios que aportan a la salud humana y a su posible utilización en la formulación de los llamados “alimentos funcionales se pueden destacar a la actividad antihipertensiva y la fijadora de minerales. La actividad antihipertensiva de estos péptidos se debe a que inhiben la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), esta enzima está asociada al sistema renina angiotensina, el cual, a su vez regula la presión arterial. Para que estos péptidos puedan ejercer sus actividades deben de ser liberados de sus secuencias proteicas precursoras, siendo la fermentación de la leche con bacterias ácido lácticas proteolíticas, una de las formas de obtención más empleadas para la generación de secuencias peptídicas bioactivas. Es por ello que se han encontrado una gran cantidad de péptidos bioactivos en quesos y leches fermentadas, ya que durante la elaboración de estos productos las bacterias lácticas utilizadas como cultivos iniciadores degradan las proteínas de la leche, principalmente las caseínas. Este sistema proteolítico de las bacterias lácticas consta de tres componentes principales: la proteinasa ligada a pared celular (CEP o PrtP), los sistemas de transporte de oligopéptidos y aminoácidos, y una gran cantidad de peptidasas, la gran mayoría de ellas, situadas intracelularmente. Dos de los géneros más utilizados para la generación de péptidos bioactivos durante el proceso de fermentación de la leche son *Lactobacillus helveticus* y *Lactococcus lactis*. Éste último es el que se utiliza en la producción de diversos quesos y leches fermentadas. A partir de éstas bacterias lácticas se han logrado producir una gran cantidad de fragmentos peptídicos, los cuales en su mayoría presentan actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ACE).

El propósito de este proyecto de investigación es lograr la generación de péptidos potencialmente bioactivos durante la fermentación de la leche con *Lactococcus lactis*, debido a la gran demanda por parte de los consumidores, de los llamados “alimentos funcionales”,

***Efecto del pH sobre el perfil de péptidos potencialmente bioactivos producidos  
por Lactococcus lactis subsp. cremoris NCFB 712***

---

los cuales aportan múltiples beneficios a quienes los consumen, más allá de su efecto nutricional.

Se determinó la capacidad de generación de péptidos bioactivos, en particular aquellos que presenten actividad fijadora de minerales y actividad inhibidora de la ACE, durante la fermentación con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712. Además de estudiar el efecto del pH en el perfil de péptidos durante las fermentaciones ya que se ha visto que las condiciones de fermentación tienen influencia en el tasa y el tipo de péptidos producidos, siendo el pH uno de los factores principales que afectan la producción de este tipo de péptidos.

## **2. Antecedentes**

### **2.1. Composición de la leche**

La leche es una secreción polifásica producida por la glándula mamaria, que contiene aproximadamente 5% de lactosa, 3.2% de proteínas, 4% de lípidos y 0.7% de sales minerales. El valor nutricional de la leche y de los productos lácteos se debe en gran parte a estos componentes. Además de estos compuestos principales, la leche contiene sustancias que brindan protección inmunológica y que presentan alguna actividad fisiológica en los neonatos y adultos (Séverin y Wenshui, 2005).

### **2.2. La leche como alimento funcional**

Desde hace cientos de años, la leche era usada para prevenir infecciones, por esta razón en un texto antiguo de origen islámico, se citaba: *“Bebe leche porque quita rápidamente el calor del corazón, fortalece a la espalda, incrementa al cerebro y aumenta la inteligencia”*. Aunque estas palabras no están fundamentadas por los estándares científicos de nuestros días, demuestran que aún en esos tiempos el consumo de la leche, traía grandes beneficios a la salud de quien la consumía. A partir del siglo XX y gracias al auge de la ciencia de la nutrición, se pudo estudiar y reconocer el valor y la cantidad de nutrientes que se encuentran en la leche. Principalmente en los últimos 30 años se ha llevado a cabo una ardua investigación acerca de la leche y los productos lácteos, que ha demostrado que éstos pueden ayudar a prevenir o reducir cierto tipo de desórdenes crónicos, como la osteoporosis, la hipertensión, la obesidad, el sobrepeso y el cáncer de colon. La prevención de estos desórdenes, se debe en gran parte, a que la leche y los productos lácteos contienen entre otras cosas, componentes (Tabla 1) que presentan algún tipo de actividad en el organismo (bioactividad).

**Tabla 1. Componentes bioactivos de la leche de vaca.**

<b>Componentes bioactivos</b>	<b>Posible bioactividad</b>	<b>Referencia</b>
Proteínas del suero	fijación de minerales regulación del sistema inmune propiedades anticancerígenas	McIntosh y col., 1995; Wong y Watson, 1995
Péptidos derivados de la caseína	regulación de la presión sanguínea propiedades anticoagulantes fijación de minerales como el calcio y el hierro regulación del sistema inmune efecto antimicrobiano	Meisel, 1997
Péptidos derivados de las proteínas del suero	regulación de la presión sanguínea regulación el sistema inmune efecto antimicrobiano	Meisel, 1997
Calcio biodisponible	regulación de la presión sanguínea efecto protector en la prevención del cáncer de colon	Séverin y Wenshui, 2005
Oligosacáridos	Inhibición del crecimiento de <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> y <i>Escherichia coli</i> enteropatógena	Shah, 2000
Componentes grasos como: ácido linoléico conjugado (CLA), la esfingomielina, el ácido butírico y el ácido mirístico	protección contra algunos tipos de cáncer y la arterioesclerosis	Pariza, 1997; Shah, 2000; Séverin y Wenshui, 2005;
Enzimas	efectos antimicrobianos y reguladores del sistema inmune	Séverin y Wenshui, 2005

Tal como se observa en la tabla 1, la leche es un sistema integral de compuestos bioactivos, entre los que se destacan las proteínas y péptidos derivados de ellas, los lípidos y carbohidratos, los cuales pueden actuar de forma sinérgica o bien de manera independiente y proveen de beneficios más allá de su contenido nutricional (Meisel, 1997).

Las diferentes fracciones de la caseína ( $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN), que pueden llegar a representar alrededor del 80% de las proteínas totales, no presentan ninguna bioactividad, pero se ha demostrado que los péptidos derivados de éstas, si presentan algunas propiedades biológicas en el organismo (Shah, 2000).

### **2.2.1. Caseínas**

Las caseínas representan aproximadamente el 80% del total de las proteínas de la leche de vaca y estas se encuentran básicamente formando complejos macromoleculares que contienen minerales (principalmente fosfato de calcio), cuya concentración llega a representar hasta el 8% de su composición. A estos complejos se les conoce como micelas. Existen cuatro fracciones principales: la  $\alpha_{s1}$  (38%), la  $\alpha_{s2}$  (10%), la  $\beta$  (36%) y la  $\kappa$ -caseína (13%). El peso molecular de cada una de las fracciones antes mencionadas va desde 20 a 25 kDa. Estas fracciones presentan una baja solubilidad a un valor de pH de 4.6. Las caseínas comparten una estructura similar, son proteínas conjugadas, la mayoría con grupos fosfatos esterificados a sus residuos de serina, los cuales son importantes para la formación de la micela de caseína. La unión del calcio a cada una de las caseínas individuales, es proporcional al contenido de fosfato. Tienen un gran número de residuos de prolina, lo cual, causa un torcimiento en la estructura e inhibe la formación de estructuras secundarias altamente ordenadas. Las caseínas tampoco contienen enlaces disulfuro, por lo que son muy estables a altas temperaturas y presentan una alta exposición de sus residuos hidrofóbicos (Cheftel y col., 1989).

### **2.2.2. Proteínas del suero lácteo**

El suero representa una rica y variada mezcla de proteínas, que poseen un amplio rango de propiedades fisicoquímicas y funcionales. Las proteínas del suero son alrededor del 20% de las proteínas totales de la leche de vaca. Las principales proteínas del suero bovino son: la  $\beta$ -lactoglobulina (50%), la  $\alpha$ -lactoalbúmina (20%), la seroalbúmina (10%) y las inmunoglobulinas (10%) y el 10% restante está compuesto de enzimas como la lactoperoxidasa, la fosfatasa alcalina la proteasa alcalina, entre otras. Son proteínas globulares típicas, que no se encuentran fosforiladas, pero algunas están glicosiladas, son insensibles al  $\text{Ca}^{2+}$  y en contraste con las caseínas, la mayoría de éstas poseen estructura terciaria y cuaternaria. Tienen menos ácido glutámico y prolina que las caseínas, pero son ricas en aminoácidos azufrados (Cys, Met) y ramificados (Leu, Val, Ile) (Cheftel y col., 1989; Fox, 2001; Walzem y col., 2002). Las proteínas del suero al ser digeridas permanecen solubles al pH ácido del estómago (lo cual contrasta con las caseínas, las cuales forman coágulos), esto provoca que su paso por el estómago sea muy rápido y que lleguen al

intestino prácticamente intactas, permitiendo que su absorción sea a través de un sector más largo del intestino. Su largo paso por el intestino facilita una gran variedad de funciones, por ejemplo, interacciones con la flora intestinal o con los minerales presentes en el bolo alimenticio, lo cual, aumenta su absorción (Jiménez y García, 2006).

### **2.3. Péptidos bioactivos**

Mellander en 1950, fue el primero en acuñar el término de “péptidos bioactivos”, cuando él sugirió que algunos péptidos fosforilados derivados de la caseína podían aumentar la calcificación de los huesos (en un proceso independiente de la vitamina D) en infantes raquíticos (Pihlanto, 2001; Korhonen y Pihlanto, 2003 b). A finales de los años 70, se pudieron aislar péptidos derivados de proteínas alimentarias que tenían actividades similares, a las que ejercen las endorfinas y las encefalinas (Hartmann y Meisel, 2007). Desde ese momento se ha podido aislar una gran cantidad de péptidos bioactivos de diversas fuentes proteicas (leche, huevo, amaranto y soya), siendo la caseína la mejor fuente para la generación de péptidos bioactivos (Pihlanto, 2001, Korhonen, 2009). Los péptidos bioactivos pueden ser definidos, como secuencias de aminoácidos inactivos dentro de la proteína precursora, pero que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación mediante una hidrólisis enzimática o química. Generalmente, son péptidos pequeños (alrededor de 3 a 20 aminoácidos) y algunos péptidos pueden ejercer múltiples actividades fisiológicas (Smacchi y Gobbetti, 2000; Korhonen y Pihlanto, 2003 b; Pihlanto y col., 2010), como por ejemplo, la secuencia 60-70 de la  $\beta$ -caseína ( $\beta$ -CN), la cual presenta actividad opiácea, antihipertensiva (inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina o ACE) e inmunoestimuladora. Esto puede deberse a que existen algunas regiones en la estructura de las caseínas, que contienen secuencias peptídicas, que ejercen diferentes efectos biológicos, a estas regiones se han nombrado “zonas estratégicas”, ya que están protegidas del rompimiento proteolítico (Smacchi y Gobbetti, 2000) debido a que contienen una gran cantidad de residuos de prolina y además de que presentan una secuencia altamente hidrofóbica (Korhonen y Pihlanto, 2003 a).

Actualmente se sabe que este tipo de péptidos tiene un gran potencial como componente de los “alimentos funcionales”, ya que administrados en pequeñas cantidades (nutricionalmente insignificantes), pueden ejercer efectos fisiológicos en el organismo.

Existe suficiente evidencia de que los péptidos bioactivos derivados de la leche pueden ser absorbidos completamente en los enterocitos a lo largo de la membrana (células de borde de cepillo) a través de distintos sistemas de transporte para posteriormente entrar al torrente sanguíneo y producir efectos sistémicos. También estos péptidos pueden ser absorbidos por medio de transportes mediados por acarreadores o bien por medio de difusión paracelular, esta última forma ha sido sugerida como el mecanismo principal de transporte de los péptidos completos a través de la monocapa celular (Shimizu, 2004). Otra forma de transporte de péptidos bioactivos que ha sido muy estudiada es el transporte en las células Caco-2 (Iwan y col., 2008), los cuales han mostrado que los péptidos con actividad opioide, inhibidora de la ACE (Foltz y col., 2008) y antihipertensiva (Quirós y col., 2008) cruzan la monocapa epitelial celular.

Tomando en cuenta su actividad específica en el organismo los péptidos bioactivos pueden ser clasificados en: i) Péptidos antimicrobianos, ii) Péptidos antitrombóticos, iii) Péptidos inmunomoduladores, iv) Péptidos fijadores de minerales, v) Péptidos opioides y vi) Péptidos antihipertensivos (inhibidores de la ACE).

### **2.3.1. Péptidos antimicrobianos**

La carga neta positiva de los péptidos derivados de las proteínas lácteas parece estar relacionada con el efecto antimicrobiano, sin embargo se ha visto que también existen péptidos derivados de la  $\beta$ -lactoglobulina, que tienen carga negativa. Debido a que la mayoría de los péptidos con actividad antimicrobiana están constituidos por una gran cantidad de péptidos de naturaleza básica, éstos pueden formar un bucle en forma de  $\alpha$ -hélice en el extremo carboxilo terminal y por consiguiente pueden provocar la formación de canales iónicos en la membrana de los microorganismos, por lo tanto, alterar su permeabilidad hasta provocar la muerte celular (Mine y Shahidi, 2006).

Algunos de los péptidos antimicrobianos derivados de la leche son los siguientes:

- **Caseidina.** Se ha logrado purificar y comprobar su actividad antimicrobiana *in vitro* contra *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* (Silva y Malcata, 2005).
- **Casocidina-I.** Se ha demostrado que impide el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus carnosus* (Meisel, 2001; Mine y Shadihi, 2006).

- **Isracidina.** Inhibe el crecimiento *in vitro* de lactobacilos y otras bacterias Gram positivas, pero sólo cuando se encuentra en altas concentraciones (0.1- 1 mg/ml) (Meisel, 1998).
- **Lactoferricina B.** Tiene efectos contra las bacterias Gram-positivas: *Bacillus*, *Listeria* y *Streptococcus* y Gram-negativas: *E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Proteus* y *Pseudomonas* (Meisel, 2001).
- **Kapacina.** Inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos como *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* (Mine y Shadihi, 2006). Este fragmento peptídico también tiene la capacidad de ligar enterotoxinas e inhibir la adhesión de virus y bacterias (Meisel, 1998).

### **2.3.2. Péptidos antitrombóticos**

En años recientes se ha comprobado que existe una gran similitud entre algunas secuencias peptídicas derivadas de la  $\kappa$ -CN, principalmente el undecapéptido Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Gln-Asp-Lys, correspondiente al fragmento 106-116, con la cadena  $\gamma$  y del fibrinógeno. Estos segmentos también conocidos como casoplatelinas pueden actuar como inhibidores de los procesos de la agregación plaquetaria y de la unión entre la cadena  $\gamma$  y del fibrinógeno humano con el receptor específico, que se encuentra en la membrana de las plaquetas (Fiat y col., 1993; Meisel, 1997). Según los estudios realizados por Fiat y col. (1989), la característica estructural similar entre la cadena  $\gamma$  y del fibrinógeno, que es la responsable de la competencia en el proceso de agregación plaquetaria, es la homología en la secuencia de aminoácidos Ile<sub>108</sub>, Lys<sub>112</sub> y Asp<sub>115</sub>. Se ha visto que el fragmento Lys-Arg-Asp-Ser que se obtiene a partir de lactoferrina ejerce una actividad antitrombótica, pero por otro mecanismo de acción, ya que inhibe, de una forma dosis-dependiente, la agregación plaquetaria inducida por ADP, gracias a la homología con el fragmento (572-575) de la cadena  $\alpha$  del fibrinógeno (Mazoyer y col., 1990). Se han encontrado péptidos antitrombóticos *in vivo* en el plasma de recién nacidos alimentados con leche materna o fórmulas infantiles elaboradas a partir de leche de vaca, con lo cual se demuestra su liberación a partir de las proteínas de la leche durante el proceso de digestión gastrointestinal (Chabance y col., 1995).

### **2.3.3. Péptidos inmunomoduladores**

Fiat y col. (1993) demostraron que la leche tiene la capacidad de estimular al sistema inmune. Por medio de pruebas *in vitro* se ha observado que la lactoferrina humana puede participar en el proceso de diferenciación de los linfocitos. Se ha visto que el sitio de unión de la lactoferrina con los linfocitos se encuentra en el péptido (4-52) del extremo amino, este péptido puede ser liberado cuando la proteína se hidroliza con tripsina (Gill y col., 2000). Los péptidos inmunomoduladores derivados de la leche provienen principalmente de la  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN y  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -LA), y tienen la propiedad de estimular la actividad fagocítica (Schlimme y Meisel, 1995) así como la modulación de las funciones de los linfocitos (Migliore-Samour y col., 1989; Kayser y Meisel, 1996; Schanbacher y col., 1997). También la inmunoreactividad de los linfocitos humanos puede verse estimulada por la presencia de varios péptidos derivados de las proteínas de la leche como los péptidos Tyr-Gly y Tyr-Gly-Gly correspondientes a fragmentos de la  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -LA) y  $\kappa$ -caseína ( $\kappa$ -CN), respectivamente, ya que estos incrementan en forma significativa la proliferación de linfocitos.

### **2.3.4. Péptidos fijadores de minerales**

En las dos últimas décadas se han realizado investigaciones de este tipo de péptidos, los cuales pueden funcionar como acarreadores de diversos minerales ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ). La importancia de estos péptidos radica en la capacidad que tienen de formar complejos solubles con el fosfato de calcio *in vitro*, lo cual resulta en un aumento en la absorción del calcio, lo que limita la precipitación de este mineral en el íleon distal (Meisel, 1997).

La alta concentración de cargas negativas en los caseinofosfopéptidos (CPP) les confiere resistencia a la proteólisis posterior. Además se ha visto que las cadenas laterales con carga negativa, en particular, las que contienen los grupos fosfatos, son las responsables de la unión de los minerales (Meisel, 1997). Silva y Malcata (2005) reportaron que los caseinofosfopéptidos además de fijar macroelementos como el calcio, el magnesio y el hierro tienen la capacidad de fijar oligoelementos como el zinc, el bario, el cromo, el níquel, el cobalto y el selenio. En estudios realizados en animales y humanos se ha registrado la presencia de caseinofosfopéptidos después de la ingestión de leche o productos lácteos fermentados (Naito y col., 1972), mostrando que estos péptidos pueden

ser encontrados de forma natural después de la ingestión de alimentos que contengan caseína y que cierta cantidad puede llegar hasta el íleon (Meisel, 2001; Hartmann y Meisel, 2007). Recientemente estos péptidos son utilizados en ciertas pastas de dientes (Prospec MI Paste™, GC Tooth Mousse™), enjuagues bucales y material dental de relleno, ya que se ha visto que ayudan a la prevención de enfermedades en los dientes (Hernández y col., 2004).

### **2.3.5. Péptidos opioides**

Los péptidos opioides derivados de la leche interactúan con los receptores opioides ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ), los cuales se encuentran en los sistemas nervioso, inmune, endocrino y el tracto intestinal (Meisel, 1997). La mayoría actúa activando a los receptores  $\mu$ , los cuales están relacionados con la motilidad intestinal (Korhonen y Pihlanto, 2003 c) y podrían ser empleados para el tratamiento de la diarrea (Meisel y Fitzgerald, 2003). Estos péptidos derivados de la leche son considerados péptidos opioides atípicos debido a que en su estructura presentan al menos dos residuos de Tyr (Meisel y Fitzgerald, 2000), sin embargo comparten la característica estructural común de los péptidos opioides endógenos y exógenos que es la presencia de Tyr en la posición amino terminal. La carga localizada en el grupo fenólico de la Tyr es esencial para la actividad opioide y su ausencia provoca la pérdida de la actividad del péptido. Se ha visto que la presencia de otro aminoácido (Phe, Tyr), puede favorecer la fijación del péptido al receptor, sobre todo cuando este aminoácido se encuentra en la tercera o cuarta posición del péptido. (Meisel, 1997; 1998; Meisel y Fitzgerald, 2000).

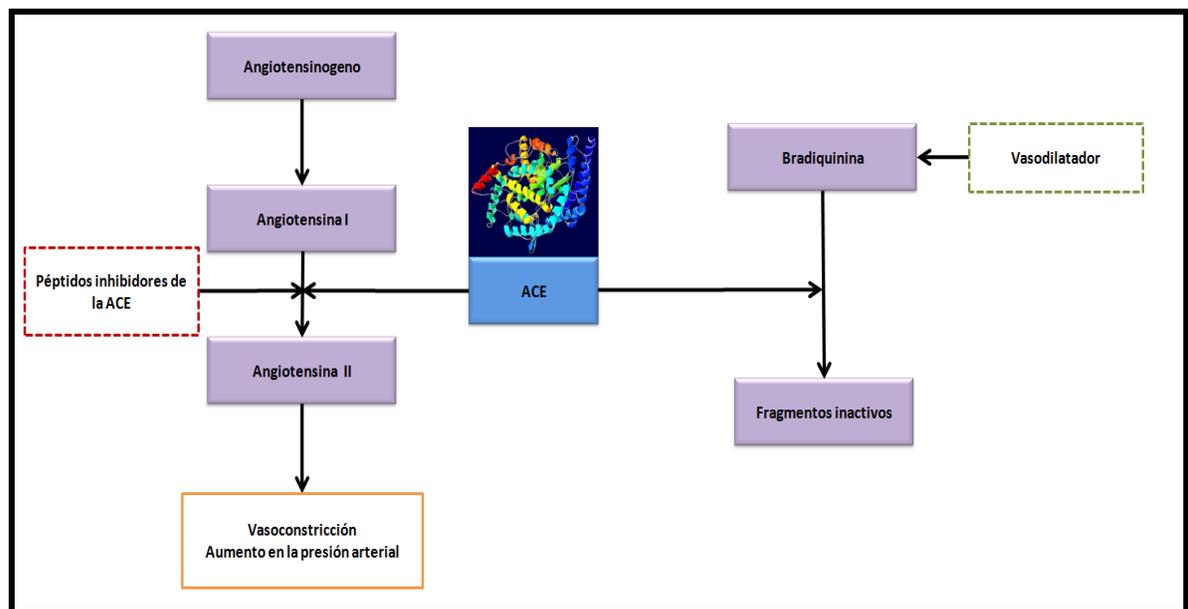
### **2.3.6. Péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE)**

En la hipertensión arterial intervienen una gran variedad de factores. Los péptidos derivados de las proteínas de la leche que actúan inhibiendo la enzima convertidora de angiotensina (ACE), y son los más estudiados.

La enzima convertidora de angiotensina (EC 3.4.15.1), también conocida como ACE (por sus siglas en inglés), es una carboxipeptidasa que se encuentra localizada en la superficie de las células vasculares endoteliales del cerebro, corazón, pulmones, hígado, intestino, páncreas, músculo esquelético y placenta (Meisel, 1997). La ACE actúa en el

sistema renina-angiotensina, (Figura 1) hidrolizando la angiotensina I (Asp-Asn-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu), un decapeptido inactivo para formar angiotensina II y el dipéptido terminal Hys-Leu. La angiotensina II es un compuesto de elevada potencia vasoconstrictora, que provoca el aumento de la presión arterial, además de que estimula la secreción de aldosterona, lo cual induce a la retención de sodio y agua y a la excreción de potasio. La acumulación de agua provoca el incremento del volumen extracelular con el consecuente aumento en la presión arterial (Silva y Malcata, 2005).

La ACE actúa de forma simultánea en el sistema quinina-caliceína, catalizando la degradación de las bradiquininas, las cuales son potentes vasodilatadores, por lo que su degradación también favorece al incremento de la presión arterial.



**Figura 1. Función de la ACE en el sistema renina-angiotensina.**

La inhibición de la ACE provoca un descenso en la presión arterial en hombres y animales. Los primeros péptidos inhibidores de la ACE de origen exógeno fueron aislados del veneno de la serpiente *Bothrops jaraca*, los cuales mostraron tener un doble efecto, ya que por un lado aumentaban la actividad de la bradiquinina y por otro inhibían a la ACE. Actualmente el fármaco más empleado para el control de la hipertensión es el captopril, con un valor de  $IC_{50}$  (cantidad mínima necesaria para inhibir en un 50% la actividad de la ACE) de  $0.006 \mu M$ . Este fármaco así como el enapril, alecepril, el lisinopril entre otros, pueden causar efectos secundarios como la hipotensión, el incremento de los niveles de potasio y la reducción de la función renal (Fitzgerald y col., 2004).

Se han encontrado péptidos con actividad inhibitora de la ACE en hidrolizados de plantas, pescados (bonito, sardina, atún) y huevo, pero los péptidos inhibidores de la ACE más estudiados son los que se obtienen de las proteínas de la leche, principalmente de las caseínas, aunque también de proteínas del suero. Los fragmentos de las caseínas que presentan un efecto antihipertensivo se denominan casoquininas y a los obtenidos a partir del suero de leche se les denomina lactoquininas. Estos péptidos tienen la capacidad de inhibir a la ACE sin causar los efectos secundarios de los fármacos.

Se ha visto que los fragmentos  $\alpha_{s1}$ -CN (23-27) y  $\beta$ -CN (177-183) presentan una elevada potencia inhibitora y se han encontrado fragmentos con una menor actividad inhibitora como el fragmento 60-67 de la  $\beta$ -CN también conocido como  $\beta$ -casomorfina-7 (Meisel, 2001). Aunque no se ha podido elucidar la relación entre la estructura y la actividad, se ha visto que los péptidos inhibidores de la ACE poseen algunas características estructurales comunes:

- Cadenas peptídicas cortas (2-9 aminoácidos)
- Presencia de residuos hidrofóbicos en la secuencia (aminoácidos aromáticos o de cadena ramificada) sobre todo en el extremo carbonilo, ya que esta región puede interactuar con tres regiones del sitio activo de la ACE
- Presencia de prolina, lisina, o arginina en el extremo carbonilo del péptido
- Resistencia a la hidrólisis por enzimas digestivas

También se ha encontrado que el extremo amino terminal también influye en la actividad inhibitora de la ACE, ya que la presencia de Val e Ile en esta región aumentan la potencia inhibitora del péptido (Meisel, 1998; Meisel, 2001; Torres y col., 2005).

Ondetti y col. (1977) propusieron que los tres últimos aminoácidos del extremo carbonilo terminal podían interactuar con los sub sitios S1, S1' y S2' del sitio activo de la ACE. Se ha visto que la ACE parece preferir sustratos o inhibidores competitivos que contengan aminoácidos hidrofóbicos en las tres posiciones antes mencionadas. Pripp y col. (2004) establecieron de forma cuantitativa la relación entre la actividad inhibitora de la ACE y las características del péptido (hidrofobicidad y aminoácidos con carga positiva en el extremo carbonilo).

## **2.4. Medios de producción y separación de los péptidos bioactivos**

Los péptidos bioactivos pueden ser liberados de la secuencia de su proteína precursora durante la hidrólisis enzimática con enzimas digestivas o enzimas proteolíticas derivadas de microorganismos o bien durante el proceso de fermentación de la leche con cultivos iniciadores (Korhonen y Pihlanto, 2003 a, b, c; Phelan y col., 2009; Hernández y col., 2011). Una vez que se conoce la estructura de los péptidos también es posible sintetizarlos por: i) síntesis química; ii) tecnología de DNA recombinante; iii) síntesis enzimática (Meisel, 2001; Korhonen y Pihlanto, 2003 a). La selección del método adecuado de síntesis depende principalmente de la cantidad y longitud del péptido que se desea sintetizar. El método de síntesis enzimática está limitado para cadenas peptídicas pequeñas. Para péptidos de mayor tamaño es recomendable utilizar la tecnología de DNA recombinante. Actualmente el método de síntesis de péptidos más empleado a nivel laboratorio es el método de síntesis química (Korhonen y Pihlanto, 2003 b).

### **2.4.1. Producción de péptidos por hidrólisis enzimática**

Es bien conocido que las proteínas y los péptidos de los alimentos son susceptibles a la hidrólisis en diferentes etapas durante la digestión gastrointestinal (ingestión, digestión y absorción). Una vez ingeridas, las proteínas son sujetas a la hidrólisis por diferentes clases de enzimas (pepsina, tripsina, quimiotripsina, carboxi- y amino-peptidasas de la superficie de las células epiteliales) lo cual produce péptidos de diferente tamaño (Hernández y col., 2011). Algunos de estos péptidos pueden tener un efecto sobre el tracto gastrointestinal, sin embargo estos pueden absorberse para alcanzar otros tejidos y órganos a través de la circulación (Shimizu, 2004).

La hidrólisis enzimática es el método más empleado para producir este tipo de péptidos, utilizando enzimas pancreáticas como la tripsina y pepsina para la liberación de algunas de las secuencias peptídicas de las proteínas de la leche. Sütas y col. (1996) demostraron que la digestión de la caseína con pepsina y tripsina producía péptidos con efectos inmunomoduladores en pruebas *invitro* realizadas en linfocitos humanos. Se sabe que algunos péptidos inhibidores de la ACE así como algunos caseinofosfopéptidos pueden ser producidos por la tripsina (Fitzgerald, 1998; Yamamoto y Takano, 1999; Pihlanto 2001; Korhonen y Pihlanto; 2003 b). También se ha visto que se generan péptidos

antihipertensivos derivados de la leche al hidrolizarla con una gran variedad de enzimas entre las que destacan la quimotripsina, la subtilisina (alcalasa), la pepsina, la pancreatina y la proteinasa K (Korhonen y Pihlanto, 2003 c).

Se han utilizado enzimas proteolíticas derivadas de microorganismos para la producción de péptidos bioactivos a partir de las proteínas de la leche. Yamamoto y col. (1994) reportaron que un hidrolizado de caseína con la proteinasa ligada a pared celular de *Lactobacillus helveticus* CP760 mostró actividad antihipertensiva en ratas espontáneamente hipertensas. Maeno y col. (1996) identificaron un péptido antihipertensivo derivado de la  $\beta$ -CN (Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln) en este mismo hidrolizado. En un estudio más reciente realizado por Mizuno y col. (2004) se midió la actividad inhibidora de la ACE en hidrolizados de caseína obtenidos con el tratamiento de nueve enzimas proteolíticas comerciales; de todas las enzimas utilizadas, una proteinasa aislada de *Aspergillus oryzae* produjo péptidos con mayor actividad inhibidora de la ACE en las pruebas realizadas *in vitro*.

#### **2.4.2. Producción de péptidos por fermentación microbiana**

Algunos de los microorganismos empleados como cultivos iniciadores son proteolíticos, esta propiedad ha sido muy explotada por la industria láctea, ya que los péptidos y aminoácidos que se generan a partir de las proteínas de la leche durante la fermentación contribuyen a darle el sabor, el aroma y la textura típicos de los productos lácteos fermentados. Los sistemas proteolíticos de algunas de las bacterias lácticas (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) se encuentran bien caracterizados. En estos sistemas se distinguen tres etapas principales: i) el primero consiste en la proteólisis inicial de la caseína por proteinasas ligadas a la pared celular para formar una gran cantidad de péptidos, ii) en el segundo paso, los péptidos generados son transportados dentro de las células por uno de los sistemas de transporte de péptidos (aminoácidos, di- y tri- péptidos y oligopéptidos, iii) y finalmente, una vez que estos se encuentran dentro de la célula, son degradados por un grupo diverso de peptidasas (endopeptidasas, aminopeptidasas, tripeptidasas y dipeptidasas), hasta la generación de aminoácidos libres, los cuales pueden ser metabolizados o asimilados (Juillard y col., 1995; Decker, 2001; Van Kranenburg y col., 2002 Korhonen y Pihlanto, 2003 b; 2006).

#### **2.4.2.1. Péptidos inhibidores de ACE producidos por fermentación**

La liberación de péptidos bioactivos durante la fermentación de la leche o de las proteínas de la leche, ha sido demostrada en una gran cantidad de estudios. La mayoría de estos trabajos reportan la producción de péptidos antihipertensivos (inhibidores de la ACE) y péptidos inmunomoduladores (Korhonen y Pihlanto, 2003 a). Nakamura y col. (1995) identificaron dos péptidos inhibidores de la ACE (Val-Pro-Pro y Ile-Pro-Pro) en una leche fermentada con un cultivo iniciador conformado por *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Pihlanto y col. (1998) estudiaron la posible formación de péptidos antihipertensivos a partir del suero de leche y caseínas utilizando varios cultivos iniciadores comerciales. Los hidrolizados obtenidos no tuvieron actividad inhibidora de la ACE, pero después de una hidrólisis posterior de estos con pepsina y tripsina, se observó una actividad inhibidora de la ACE que variaba de 35 a 61 % para los hidrolizados obtenidos de suero de leche y del 86 % para los hidrolizados obtenidos de la caseína. Se observó además que la mayoría de los péptidos antihipertensivos derivados de la caseína provenían de la  $\alpha_1$ - y  $\beta$ -CN (Korhonen y Pihlanto, 2003 a; 2006). Gobbetti y col. (2000) demostraron la generación de péptidos inhibidores de la ACE durante la fermentación de la leche con cada uno de los microorganismos, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Las fracciones de las leches fermentadas que presentaron una mayor potencia inhibidora de la ACE fueron péptidos derivados de la  $\beta$ -CN cuyos valores de  $IC_{50}$  eran 8 y 11.2  $\mu\text{g/mL}$ .

Maeno y Takano (1999) identificaron un dipéptido inhibidor de la ACE (Tyr-Pro) en un producto tipo yogurt fermentado con *Lactobacillus helveticus* CPN4. Se encontró que esta secuencia es derivada de las fracciones principales de la caseína y que su concentración va en aumento con respecto al tiempo de fermentación, alcanzando una máxima concentración de 8.1  $\mu\text{g/mL}$ . Matar y col. (2001) encontraron secuencias con propiedades inmunomoduladoras en leche fermentadas con *Lactobacillus helveticus*.

Fuglsang y col. (2003) probaron la capacidad de generar péptidos antihipertensivos que presentaban las bacterias ácido lácticas con 26 cepas silvestres, las cuales generaron péptidos inhibidores de la ACE en diferentes concentraciones. El efecto inhibidor de la ACE de los hidrolizados fue probado *in vivo* en ratas con presión arterial normal. En estudios realizados por Ashar y Chand (2004) se logró identificar un péptido antihipertensivo con secuencia Ser-Lys-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile derivado de la  $\beta$ -CN y con un valor de

**Efecto del pH sobre el perfil de péptidos potencialmente bioactivos producidos por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712**

---

IC<sub>50</sub> de 1.7 mg/ml; este péptido fue obtenido durante la fermentación de la leche con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. También se obtuvo un péptido inhibidor de la ACE derivado de la  $\beta$ -CN (Ser-Lys-Val-Tyr-Pro) con un IC<sub>50</sub> de 1.4 mg/ml a partir de una fermentación de la leche con *Streptococcus thermophilus* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. Estos péptidos son estables a la acción de las enzimas digestivas y a valores de pH ácidos y alcalinos, así como al almacenamiento refrigerado (5-10° C) durante cuatro días (Korhonen y Pihlanto, 2006).

Algaron y col. (2004) evaluaron la capacidad de generación de péptidos inhibidores de la ACE durante la fermentación de la leche con una cepa silvestre de *Lactococcus lactis* y sus mutantes, las cuales carecían de la actividad de alguna de sus peptidasas; la mayor actividad inhibidora de la ACE (75%) se encontró en la cepa que carecía de la actividad de la aminopeptidasa N.

También se ha demostrado que durante el proceso de maduración del queso Cheddar se pueden generar fragmentos peptídicos con actividad inhibidora de la ACE, con valores de inhibición que van desde el 80 % para el queso elaborado sólo con *Lactococcus lactis*, hasta 90% en los quesos Cheddar elaborados con diferentes cultivos adjuntos (Ong y Shah, 2008).

Pihlanto y col. (2010) estudiaron la capacidad de generación de péptidos en 25 bacterias ácido lácticas durante la fermentación de la leche, dentro de las cuales se encontraban algunas cepas de *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Se observó que la actividad inhibidora de la ACE esta correlacionada con el grado de hidrólisis durante la fermentación. Las cepas que presentaron una mayor actividad inhibidora de la ACE fueron las siguientes: *Lactobacillus casei* 17 (74 % de inhibición de la ACE), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* 358 (68%), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* 356 (64%), *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (63%) y *Lactococcus lactis* subsp. ATCC 19435 (57%).

Otte y col. (2011) estudiaron el efecto de la temperatura y la autólisis sobre la actividad inhibidora de la ACE y los perfiles péptidicos en leches fermentadas por dos cepas de *Lactobacillus helveticus* y dos de *Lactococcus lactis*, encontraron que la temperatura de fermentación tenía un efecto sobre el crecimiento microbiano, el grado de lisis y la actividad inhibidora de la ACE. La actividad inhibidora de la ACE fue más elevada a la temperatura óptima del microorganismo. El proceso de fermentación de las leches con las cepas de *Lactococcus lactis* fue detenido a dos valores de pH, 4.6 y 4.3. Las dos cepas de

*Lactococcus* empleadas (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* F3 y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CHCC3906) tuvieron una inhibición del 50% cuando las fermentaciones alcanzaban valores de pH de 4.3.

#### **2.4.2.2. Péptidos fijadores de minerales producidos por fermentación**

Los péptidos fijadores de minerales también conocidos como caseinofosfopéptidos que contienen la secuencia -Ser-Ser-Ser- Glu-Glu-, pueden ser generados *in vivo* o *in vitro* a partir de la hidrólisis enzimática de las caseínas ( $\alpha$ <sub>s1</sub>-CN,  $\alpha$ <sub>s2</sub>-CN y  $\beta$ -CN). Existen muy pocos estudios acerca de la producción de estos péptidos utilizando a las enzimas proteolíticas de las bacterias ácido lácticas o bien durante el proceso de fermentación de la leche con estas bacterias. En un estudio realizado por Dimitrov (2009), se evaluó la capacidad de producción de péptidos fijadores de minerales por 210 bacterias ácido lácticas, de las que se seleccionaron 20 cepas, que presentaron una mayor actividad. La cepa que presentó la mayor actividad fijadora de calcio fue *Lactobacillus casei* C3 (6.4 mmoles de Ca<sup>2+</sup>/mL). Algunos de los péptidos fijadores de calcio encontrados fueron los siguientes:  $\alpha$ <sub>s1</sub>-CN (59-70) en la leche fermentada con *Lactobacillus helveticus* L1,  $\beta$ -CN (15-20) en la leche fermentada con *Lactobacillus casei* C3 y  $\alpha$ <sub>s1</sub>-CN (37-58) en la fermentación con *Lactobacillus bulgaricus* J24.

Corsetti y col. (2003) lograron obtener caseinofosfopéptidos a partir de la hidrólisis de leche de diversos animales (vaca, búfalo, humano, oveja, cabra y cerdo) con la proteinasa parcialmente purificada de *Lactobacillus helveticus* PR4. En este estudio, también se determinó su actividad fijadora de calcio, con valores que van desde los 2.5 mg de Ca<sup>2+</sup>/mg de CPP en la leche humana hasta 11.4 mg de Ca<sup>2+</sup>/mg de CPP en la leche de búfalo.

#### **2.5. Sistema proteolítico de *Lactococcus lactis***

El sistema proteolítico de *Lactococcus lactis*, es el más estudiado y documentado, de todos los sistemas proteolíticos de las bacterias ácido lácticas (BAL) (Figura 2). Por ello, es el más utilizado para explicar los sistemas proteolíticos de las BAL. Debido a la escasa cantidad de aminoácidos en la leche, las BAL requieren utilizar el sistema proteolítico para suplir sus necesidades de compuestos nitrogenados para poder crecer. Este sistema está compuesto de una proteinasa ligada a pared celular (CEP o PrtP), un sistema de transporte

para oligopéptidos, sistemas de transporte para di- y tripéptidos y una gran cantidad de peptidasas, la mayoría de ellas localizadas intracelularmente. En estudios realizados con varias cepas de *Lactococcus lactis* se ha observado que la inactivación de las peptidasas o bien de los sistemas de transporte de dipéptidos y tripéptidos, no tiene un efecto significativo en el crecimiento del microorganismo en la leche, pero la inactivación de la proteinasa de pared celular o del sistema de transporte de oligopéptidos o ambos afectan fuertemente el crecimiento del microorganismo en la leche. Por ello, se sugiere que estos dos elementos son parte esencial del sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* (Helinck y col., 1997).

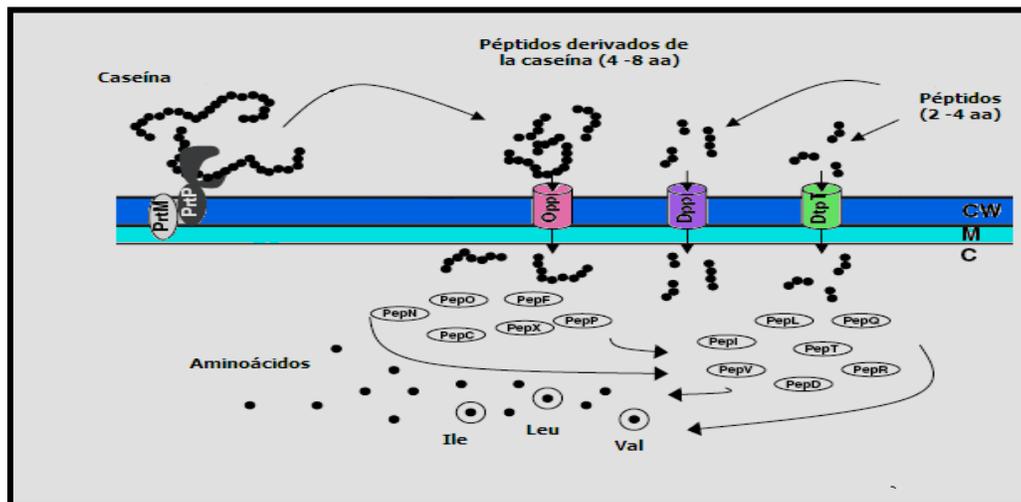


Figura 2. Sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* (Savijoki y col., 2006).

### 2.5.1. Proteinasas

Las proteinasas son las encargadas de realizar el primer paso en la degradación de la caseína, estas se encuentran ligadas a la pared extracelular y se les designa también como PrtP o CEP. Algunas de las características importantes de las proteinasas son las siguientes (Smid y col., 1991; Pritchard y Coolbear, 1993; Tan y col., 1993; Kok y De Vos, 1994):

- Son proteínas grandes con pesos moleculares de 140 kDa
- Son serinoproteinasas y se ha probado que son inhibidas por el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y el diisopropilfluorofosfato (DFP).
- Tienen pH óptimo de 6 (5.5-6.5).

Visser y col. (1986) propusieron una clasificación de las proteinasas basándose en la especificidad del sustrato: 1) Tipo P<sub>I</sub> que actúa principalmente sobre la  $\beta$ -CN, y 2) Tipo P<sub>III</sub> que actúa sobre la  $\alpha$ s1-CN,  $\kappa$ -CN,  $\beta$ -CN. Se sabe que la proteinasa ligada a pared celular de

**Efecto del pH sobre el perfil de péptidos potencialmente bioactivos producidos por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712**

---

*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 es del tipo I (Helinck y col., 1997). Se ha demostrado que las proteinasas de tipo P<sub>1</sub>, tienen la capacidad de formar más de 100 oligopéptidos diferentes a partir de  $\beta$ -CN y que el tamaño de estos va de 4 a 30 aminoácidos, pero la mayor parte están en el rango de 4 a 10 aminoácidos. (Savijoki y col., 2006). Más del 50% de estos péptidos generados se originan del extremo C-terminal de la  $\beta$ -CN mientras que otro 25% de péptidos son derivados de la región 60-105 de esta misma proteína. También se ha observado que no existe producción significativa de aminoácidos (a excepción de la fenilalanina) ni de di y tripéptidos (Juillard y col., 1995). Los péptidos derivados de la caseína hidrolizados por la CEP-I presentan una alta proporción de prolina. Debido a que *Lactococcus lactis* puede sintetizar grandes cantidades de peptidasas específicas para prolina, puede acumular al interior de la célula, dipeptidos con prolina, los cuales, regulan la producción de la CEP-I (Helinck y col., 1997). En otros estudios se ha demostrado que la especificidad de la proteinasa ligada a pared celular tipo I (PrtP<sub>1</sub> o CEP<sub>I</sub>) sobre el fragmento 1-23 de la  $\alpha_{s1}$ -CN, puede variar al modificarse el pH del medio de fermentación, con una mayor preferencia a cortar los enlaces 8-9, 9-10 de la secuencia antes mencionada, cuando el medio de fermentación se encuentra a un pH cercano a 6.5 mientras que cuando el pH se encuentra cercano a 5.2 existe una mayor preferencia a cortar el enlace 13-14, además de hidrolizar los enlaces 16-17 y 17-18. (Figura 3) (Exterkate y Alting, 1993; Fernández-Espla y col., 2000). Se ha visto que la carga en el extremo amino terminal del enlace a romper del fragmento 1-23 de la  $\alpha_{s1}$ -CN parece ser determinante para la unión del sustrato, lo cual indica que las fuerzas electrostáticas juegan un papel importante en la selección de los enlaces peptídicos que van a ser hidrolizados. La CEP-I preferentemente se une con péptidos con la parte del extremo amino cargada positivamente mientras que la CEP-III se une a péptidos con el extremo amino cargado negativamente (Figura 3) (Exterkate y Alting, 1993). Se ha desarrollado un sitio en la red, llamado BIOPEP (Base de Datos de péptidos y proteínas bioactivas), el cual, permite conocer los sitios de corte en las proteínas principales de la leche realizados por la proteinasa ligada a pared celular (CEPI) (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia>).

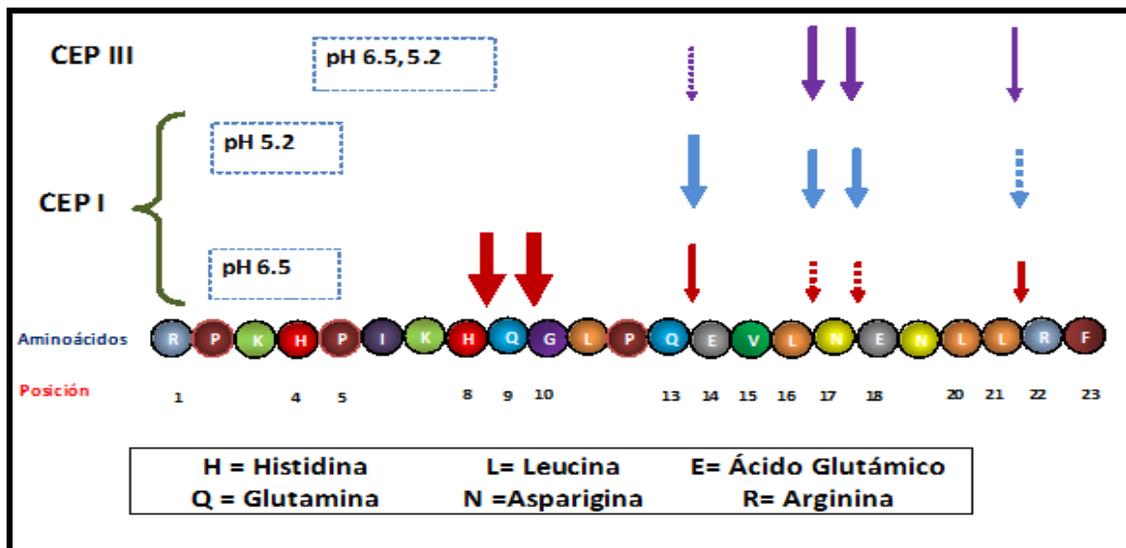


Figura 3. Especificidad de la CEP<sub>I</sub> y CEP<sub>III</sub> de *Lactococcus lactis* sobre la  $\alpha_{s1}$ -CN (1-23) (Fernández-Espla y col., 2000).

### 2.5.2. Sistemas de transporte de aminoácidos y péptidos

El segundo paso en la utilización de la caseína por medio de las bacterias ácido lácticas es el transporte de los péptidos generados por las proteinasas al interior de las células mediante la acción de diversos sistemas de transporte (Figura 4). Se han podido describir varios sistemas de transporte para aminoácidos, para di/tripéptidos y oligopéptidos. Se sabe que *Lactococcus lactis* posee al menos 10 sistemas de transporte de aminoácidos, los cuales presentan una alta especificidad para aminoácidos estructuralmente muy similares como Glu/Gln, Leu/Ile/Val, Ser/Thr, Ala/Gly, Lys/Arg/Orn (Konings y col., 1989; Kunji y col., 1996). También existe un sistema de transporte secundario para di/tripéptidos hidrofílicos (DtpT) que funciona gracias a un gradiente de protones, así como otro sistema que transporta a los di/tripéptidos hidrofóbicos (Dpp) que funciona mediante la hidrólisis de ATP (Savijoki y col., 2006). Se ha demostrado que el Dpp es indispensable para el crecimiento de *Lactococcus lactis* en un medio que contiene caseína (Law y Haandrikman, 1997).

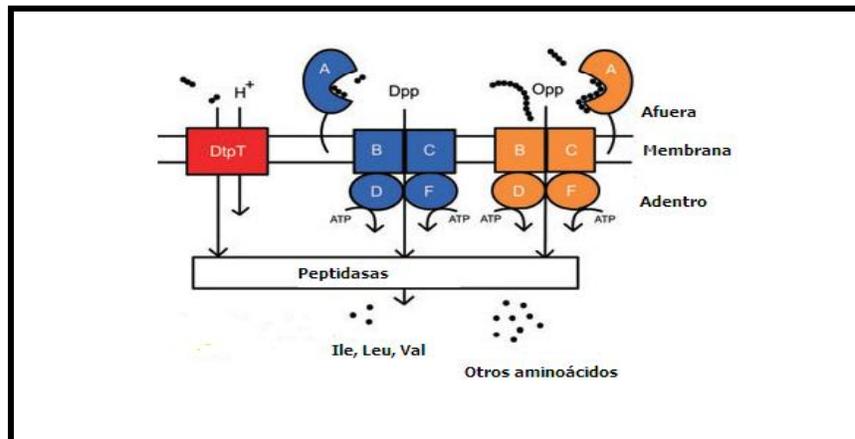


Figura 4. Sistemas de transporte de péptidos en *Lactococcus lactis* (Doeven y col., 2005)

### 2.5.3. Peptidasas

El tercer paso del sistema proteolítico se lleva a cabo una vez que los péptidos derivados de las caseínas han sido transportados hacia el interior de las células de las bacterias lácticas, éstos son degradados por la acción de peptidasas, las cuales pueden tener especificidades diferentes o traslapadas. Las endopeptidasas intracelulares, las aminopeptidasas generales (PepN y PepC) y la X-propil-dipeptidil aminopeptidasas son las primeras enzimas que actúan sobre los oligopéptidos (Savijoki y col., 2006).

### 2.6. Género *Lactococcus*

Los lactococos son bacterias Gram positivas, microaerobias. Son células esféricas u ovoides que tienen un diámetro promedio de 0.5  $\mu\text{m}$ , estas células pueden encontrarse en pares o en cadenas cortas. El género *Lactococcus* está conformado por las especies *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garviae*, *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus piscium*, y *Lactococcus raffinolactis*. Los ambientes de este género principalmente son la leche y productos lácteos pero también han sido aislados de plantas, alimentos secos y congelados no sometidos a tratamiento térmico. La especie más representativa de este género es *Lactococcus lactis* (Teuber y Geis, 2006).

### **2.6.1. *Lactococcus lactis***

Los miembros de la especie de *Lactococcus lactis* son bacterias mesófilas, anaerobias facultativas, que no forman esporas y no presentan motilidad. Morfológicamente son esféricas u ovoides y se presentan en pares o formando cadenas cortas. Metabolizan a los carbohidratos de forma homofermentativa, produciendo principalmente ácido láctico L (+) a partir de la glucosa. Filogenéticamente se encuentran clasificados con la subdivisión de los *Clostridium* dentro de las bacterias Gram positivas. Se reconocen dos subespecies *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* puede crecer a 40°C con un 4% de NaCl mientras que *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* no puede crecer en estas condiciones. Además de estas subespecies existe una biovariante *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis*, la cual puede metabolizar citrato.

Las cepas de *Lactococcus lactis* son auxótrofas a una gran cantidad de aminoácidos: isoleucina, valina, leucina, histidina, metionina, arginina, prolina, glutamato, serina y treonina. Existen también ciertas vitaminas necesarias para el crecimiento óptimo como la biotina, el piridoxal, el ácido fólico, la niacina, la tiamina y el ácido pantoténico. Como *Lactococcus lactis* es un organismo mesófilo sus temperaturas óptimas se encuentran entre los 25 y 30 °C. Su crecimiento se ve inhibido a pH menor de 4.5. *Lactococcus lactis* no requiere el oxígeno para crecer pero puede tolerarlo debido a que posee enzimas necesarias para el metabolismo del oxígeno (Courtney, 1999).

### **2.6.2. Importancia industrial de *Lactococcus lactis***

Las características relevantes de *Lactococcus lactis* han sido muy estudiadas, debido a que durante la fermentación de la leche se producen varios compuestos de interés por el impacto en el sabor, textura y conservación del producto lácteo fermentado (Tabla 2).

Las cepas de *Lactococcus* utilizadas como cultivos iniciadores deben de metabolizar rápidamente la lactosa a ácido láctico, bajo condiciones de exceso de fuente de carbono. Este ácido permite que los productos lácteos fermentados se conserven por más tiempo. El bajo pH inhibe el crecimiento de muchas bacterias patógenas y de descomposición. Algunas cepas de *Lactococcus lactis* pueden asimilar los azúcares simples para formar polisacáridos complejos, los cuales son excretados y permanecen asociados a la superficie celular

**Efecto del pH sobre el perfil de péptidos potencialmente bioactivos producidos por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712**

---

(exopolisácaridos). Estos compuestos le dan una textura espesa a algunos productos fermentados y también pueden actuar como estabilizantes.

**Tabla 2. Contribución de *Lactococcus lactis* al sabor, aroma, textura y conservación en los productos lácteos fermentados**

<b>Ruta Metabólica</b>	<b>Contribución al sabor, aroma y textura</b>	<b>Contribución a la conservación</b>
Metabolismo de carbohidratos	Producción de ácido láctico, etanol, acetato, diacetilo, exopolisácaridos y otros compuestos	Producción de ácido láctico, otros ácidos orgánicos y diacetilo
Metabolismo de proteínas	Producción de péptidos, aminoácidos, consumo de péptidos amargos	
Metabolismo de lípidos	Puede producir ácidos grasos volátiles	
Metabolismo del oxígeno		Peróxido de hidrógeno
Producción de bacteriocinas		Bacteriocinas

A pesar de que la leche es rica en el contenido protéico, no presenta una gran cantidad de aminoácidos libres, es por ello que las cepas de *Lactococcus lactis* empleadas como cultivos iniciadores deben de contar con un sistema proteolítico, el cual le permite adquirir los aminoácidos esenciales para su crecimiento a partir de las proteínas de la leche. Una efectiva proteólisis de las proteínas de la leche no sólo es esencial para el crecimiento de la cepa sino también para la producción de ácidos durante la fermentación. La proteólisis también impacta en el sabor de los productos lácteos fermentados, algunos de los péptidos, aminoácidos y derivados de aminoácidos que son producidos por las cepas de *Lactococcus* utilizadas como cultivo iniciador contribuyen de forma positiva en el desarrollo de aromas y sabores durante la elaboración de los quesos; aunque también pueden producirse péptidos con sabor amargo durante la proteólisis (Courtney, 1999).

### **3.- Justificación**

Durante el proceso de fermentación de la leche por la acción de cultivos iniciadores proteolíticos se han logrado producir secuencias peptídicas bioactivas, debido a que la mayoría de los cultivos iniciadores son bacterias ácido lácticas y tienen un sistema proteolítico que les permite degradar las proteínas de la leche a péptidos y aminoácidos (Hayes y col., 2007). Dentro de toda la gama de las bacterias lácticas podemos destacar a *Lactococcus lactis*, la cual, ha demostrado tener una gran capacidad para producir compuestos nutraceúticos, como son los péptidos bioactivos (Hugenholtz y Smid., 2002).

En estudios previos se logró comprobar que *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 produce péptidos con un peso molecular inferior a los 14,000 Da, los cuales pueden ser potencialmente bioactivos (Figuroa, 2007). Por otra parte, se ha visto que las condiciones de fermentación pueden influir en el grado de proteólisis y en el tipo de péptidos producidos. En algunas cepas de *Lactococcus lactis*, se ha observado que la especificidad de la proteinasa ligada a pared celular (CEP) puede variar cuando varía el pH del medio de fermentación (Fernández-Espla y col., 2000).

Debido a que el valor de pH del medio de fermentación está relacionado con la tasa de proteólisis y la especificidad de la proteinasa de pared celular (CEP-I), este trabajo evaluó el efecto que tiene el control de pH sobre el perfil peptídico durante la fermentación de la leche con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712. Así mismo, se evaluaron las actividades biológicas de los fragmentos peptídicos producidos durante la fermentación, en particular la capacidad de la inhibición de la ACE así como la fijación de calcio y hierro.

## **4.-Objetivos**

### **4.1.- Objetivo general**

Estudiar el efecto del pH en la producción de péptidos potencialmente bioactivos generados durante la fermentación de la leche con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712.

### **4.2.- Objetivos particulares**

- Evaluar el efecto del pH en el perfil de péptidos producidos durante la fermentación de la leche por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712.
- Estudiar el efecto del control de pH en la fermentación durante la producción de péptidos por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712.
- Determinar la actividad inhibidora de la ACE y la actividad fijadora de hierro y calcio que presentan los péptidos generados durante las fermentaciones con y sin control de pH con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712.

## **5.-Hipotésis**

Mediante la fermentación de la leche con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 se puede generar un perfil amplio de péptidos con posibles actividades biológicas, el cual puede ser afectado por el pH del medio, posiblemente por su efecto en la actividad de las enzimas proteolíticas del microorganismo.

## 6. Metodología

### 6.1. Conservación y acondicionamiento del microorganismo

La cepa utilizada fue *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 de la colección nacional de bacterias alimentarias del Reino Unido (National Collection of Food Bacteria, Reading, Reino Unido). La cepa estaba conservada en forma de chaquiras utilizando leche como medio protector, almacenada a una temperatura de -15°C.

Los medios y leches utilizados para el acondicionamiento de la cepa fueron los siguientes:

- Medio de cultivo Mann Rogosa Sharpe (MRS) (Difco, Detroit, USA).
- Medio de cultivo Litmus Milk (Difco, Detroit, USA).
- Leche en polvo descremada al 10% en agua destilada.

Para lograr la activación del microorganismo las perlas de *Lactococcus lactis* se inocularon en medio Litmus Milk previamente esterilizado; posteriormente se incubaron por 24 h a 30°C. Cuando los tubos con este medio presentaron crecimiento, se realizó una tinción de Gram para descartar cualquier tipo de contaminación. Una vez comprobada la pureza se procedió a inocular de este medio al medio MRS previamente esterilizado, y se incubó durante 24 h a una temperatura de 30°C. Este cultivo se inoculó al 5% en 100 mL de leche descremada en matraces de 250 mL. En cada uno de estos cultivos se realizaron tinciones de Gram para descartar cualquier tipo de contaminación. Estos últimos cultivos se utilizaron para inocular los medios en los que se llevaron a cabo las fermentaciones.

La metodología de la activación de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 se muestra en la figura 5.



**Figura 5. Propagación de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712.**

## **6.2. Preparación de la leche para la fermentación**

Para el desarrollo de esta parte experimental se utilizó leche descremada con 20% de sólidos totales, la cual se preparó de la siguiente manera:

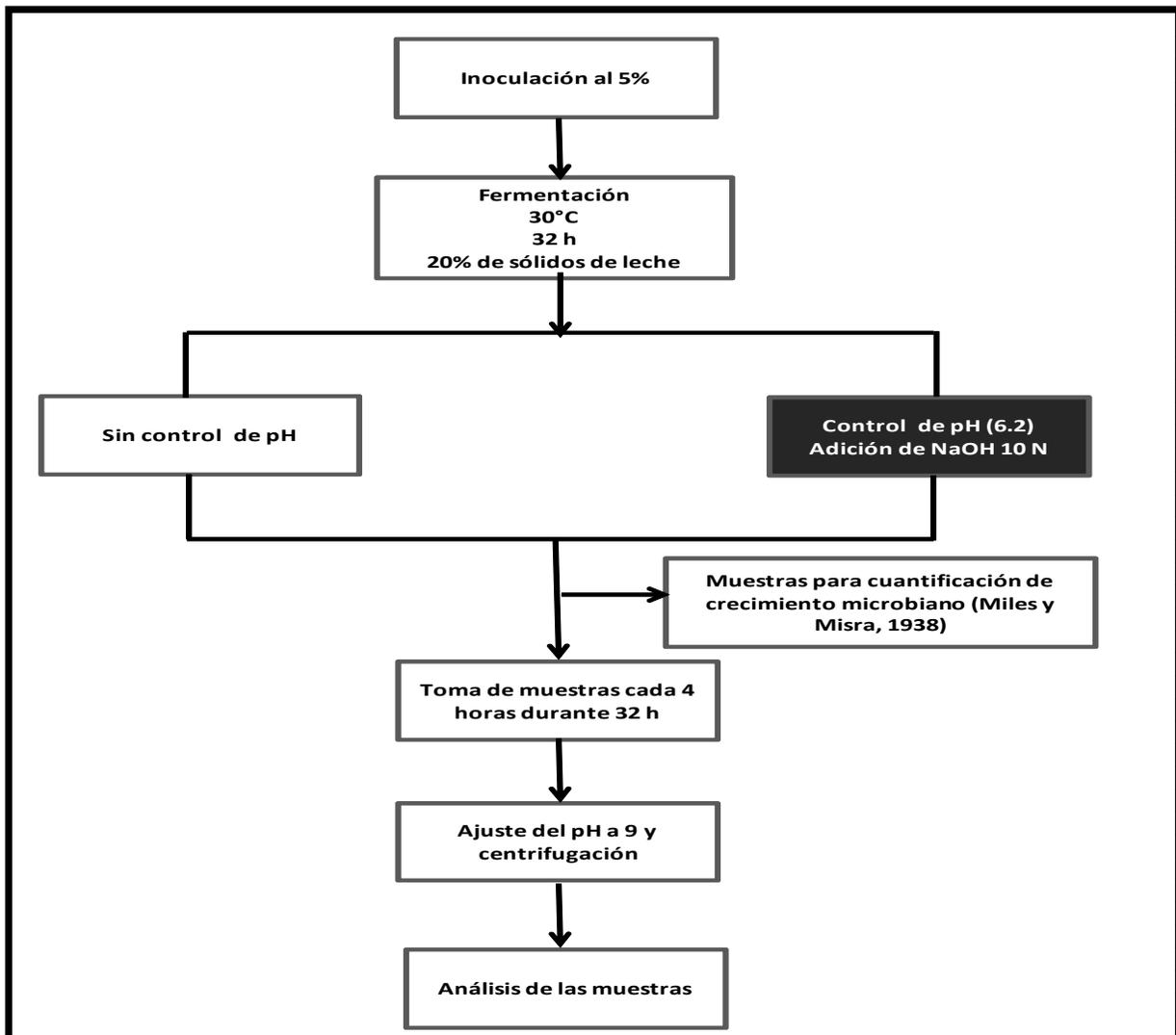
- **Leche al 20%:** Se agregaron 120 gramos de leche Alpura descremada en polvo a un matraz que contenía 600 mL de agua destilada, se homogenizó perfectamente y se esterilizó a 121°C durante 5 minutos.

Esta leche se utilizó para realizar las fermentaciones a diferentes condiciones de pH:

- **Fermentación a pH 6.2:** el pH se mantuvo constante durante el proceso adicionando NaOH (10 N) cada dos horas con el fin de contrarrestar los ácidos producidos por *Lactococcus lactis* durante la fermentación. El pH de esta fermentación corresponde al rango de pH óptimo de la proteinasa ligada a pared celular (CEP) de la bacteria.
- **Fermentación sin mantener el pH constante:** es decir el pH disminuyó durante el proceso debido a la síntesis de ácidos orgánicos de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712.

## **6.3. Fermentación**

La leche que se utilizó para la realización de las fermentaciones con y sin control de pH fue inoculada con el cultivo obtenido según se indica en la sección 6.1. Se adicionaron 30 mL (5 % de inóculo) de este cultivo a 600 mL de leche preparada para la realización de los experimentos. Posteriormente las fermentaciones (con y sin control de pH) fueron incubadas a una temperatura de 30°C durante 32 horas. La metodología utilizada para las fermentaciones se muestra en la figura 6.

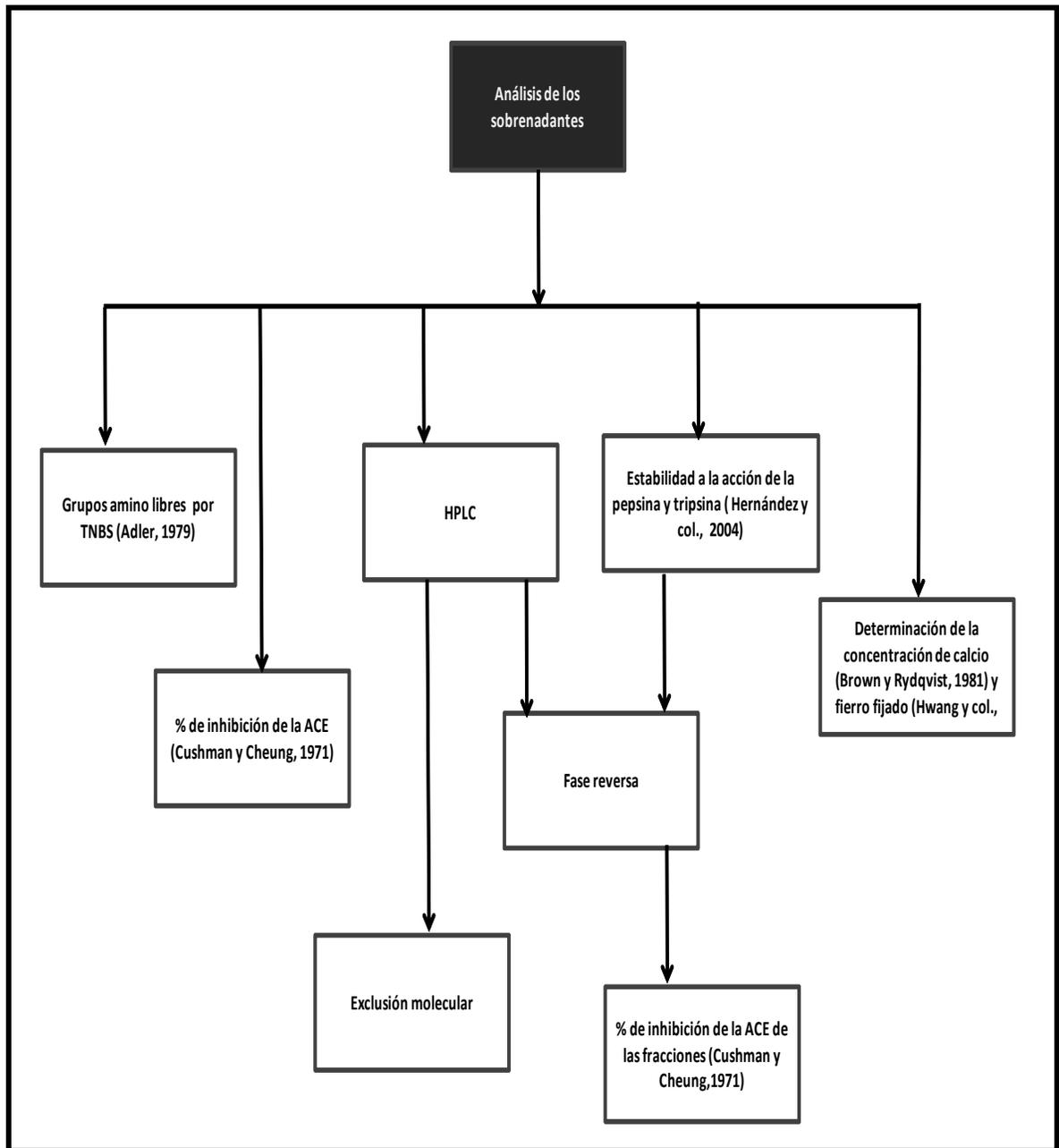


**Figura 6. Metodología empleada para realización de las fermentaciones.**

En la fermentación con control de pH, se ajustó el pH del medio cada 2 horas, con NaOH (10 N) en condiciones de esterilidad para mantener el pH del medio dentro del rango de 6.0-6.4. Esto se realizó con el fin de poder observar el efecto del pH sobre las variables respuesta: crecimiento microbiano, concentración de grupos amino libres, el perfil peptídico, grado de inhibición de la ACE, y el grado de fijación del calcio y hierro.

Se tomaron 10 mL de muestra cada 4 horas y se le ajustó el pH a 9, posteriormente se centrifugaron a 10000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido fue almacenado a -18°C para ser utilizado en cada uno de los análisis (Figura 7).

En la figura 7 se muestra el esquema de los análisis realizados para las muestras de las fermentaciones.



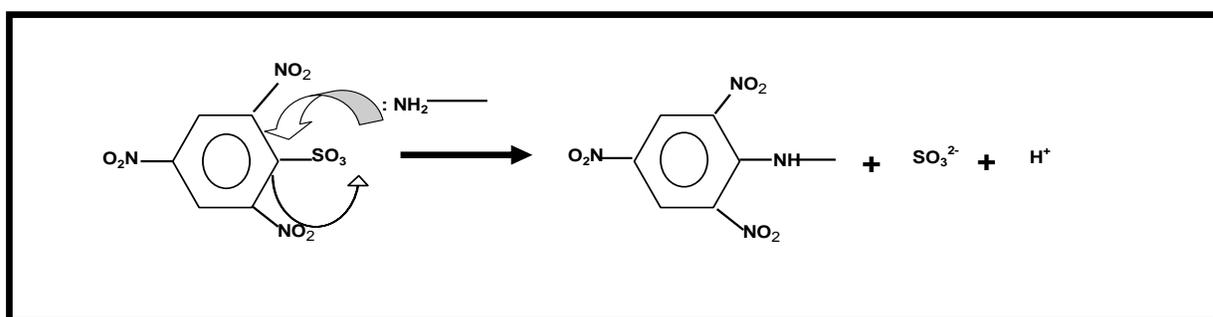
**Figura 7. Metodología de los análisis realizados a las muestras de las fermentaciones.**

#### **6.4. Crecimiento microbiano**

El crecimiento microbiano fue cuantificado por medio de la siembra en placa con agar MRS utilizando la técnica de Miles y Misra (1938). Las placas fueron incubadas a 30°C durante 48 horas.

## 6.5. Determinación de grupos amino libres por el método del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS)

Para cuantificar los péptidos que generó *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 durante su crecimiento en leche, se realizó la determinación de péptidos solubles por medio de la técnica del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS, Fluka, Buchs, Suiza)). Esta técnica mide grupos amino libres en hidrolizados protéicos (Adler, 1979), se basa en la reacción del TNBS con las aminas primarias en condiciones ligeramente alcalinas (pH 8.2), como se muestra en la Figura 8.



**Figura 8. Reacción del TNBS con los grupos aminos terminales (Adler, 1979).**

Procedimiento:

1. Se agregaron 2 mL de buffer de fosfatos pH 8.2 en un tubo de reacción.
2. Posteriormente se agregaron 0.250 mL de la muestra (tiempos 0, 4, 8, 16, 20, 24, 28 y 32 de ambas fermentaciones).
3. Se agregaron 2 mL de la solución de TNBS al 0.10%.
4. Se agitó bien el tubo de reacción y se incubó a una temperatura de 50°C durante 60 minutos. Se debe de mantener los tubos de reacción aislados de la luz.
5. Se agregaron 4 mL de HCl 0.1N (para detener la reacción).
6. Las muestras se leyeron a 340 nm contra un blanco conformado por los reactivos y el agua desionizada.

Se elaboró una curva patrón utilizando una solución de glicina 3mM con 1% de SDS, el cual se adiciona para dispersar las muestras de hidrolizados no centrifugados. Todos los reactivos se prepararon con agua desionizada.

## 6.6. Grado de inhibición de la ACE

La inhibición de la ACE indica la presencia de péptidos con actividad antihipertensiva. Uno de los métodos más empleados para la determinación del grado de inhibición de la ACE es el desarrollado por Cushman y Cheung (1971), el cual se basa en la medición espectrofotométrica a 228 nm del ácido hipúrico. Este método consta de varias etapas que incluyen la extracción del ácido, evaporación, disolución en agua y medición de la absorbancia del ácido a 228 nm. En este trabajo se utilizó el método de Cushman y Cheung (1971) modificado, la reacción se muestra en la figura 9.

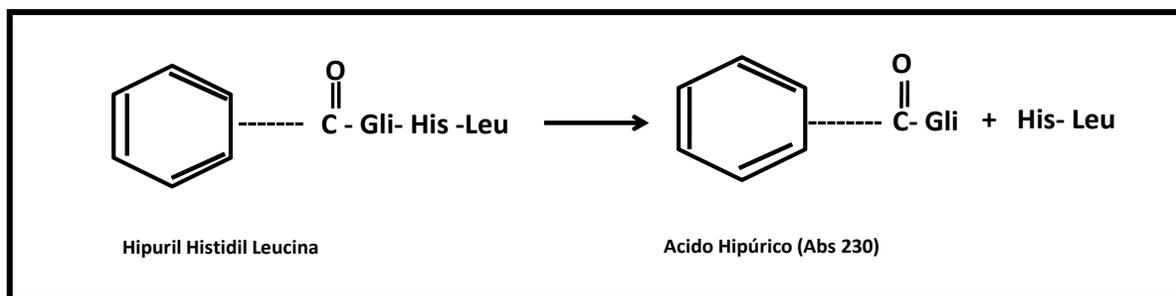


Figura 9. Reacción catalizada por la ACE, según el método de Cushman y Cheung.

El procedimiento de esta técnica es el siguiente:

1. Se ajustó el pH de las muestras a 8.3.
2. Se tomaron 80  $\mu$ L de la muestra ajustada y 200  $\mu$ L del buffer de sustrato. El buffer de sustrato estaba conformado por una solución de buffer de boratos 0.1M pH 8.3 con 0.3M de NaCl y 5mM de hipuril-histidil-leucina (HHL).
3. Se agregó 20  $\mu$ L de la enzima (ACE 1 U/mL).
4. Se agitaron las muestras y posteriormente fueron incubadas a 37 °C por una hora.
5. La reacción se detuvo adicionando 0.250 mL de HCl 1N.
6. Se agregaron 1.7 mL de acetato de etilo para lograr la extracción del ácido hipúrico, los tubos fueron agitados y posteriormente centrifugados a 4500 rpm por 5 minutos
7. Se tomaron 400  $\mu$ L de la fase orgánica (arriba) y se calentó a 95°C por 30 minutos
8. Se resuspendieron con 2 mL de agua destilada y se midió la absorbancia a 230 nm
9. Se prepararon tubos con el 100% de actividad (80  $\mu$ L de buffer sin sustrato) y 0% de actividad al cual se le agregaron 20  $\mu$ L de agua.

El grado de inhibición de la ACE se calculó con la siguiente fórmula

Donde:

ABS<sub>100%</sub>: Es la absorbancia de la ACE y el sustrato (100% de actividad)

ABS<sub>muestra</sub>: Es la absorbancia de la ACE, el sustrato y el hidrolizado

ABS<sub>0%</sub>: Es la absorbancia del sustrato (0% de actividad).

### **6.7. Determinación del IC<sub>50</sub>**

El valor del IC<sub>50</sub> nos indica la concentración necesaria del péptido o el hidrolizado para lograr una inhibición en un 50% de la ACE, además de que nos permite conocer el grado de pureza o la potencia de los péptidos que presentan esta actividad. En nuestro caso sólo nos puede indicar la potencia de inhibición de los sobrenadantes de las fermentaciones. Se sabe que mientras menor sea el valor de IC<sub>50</sub> mayor será la potencia del péptido, hidrolizado o leche fermentada. Para esta determinación se utilizaron tres diluciones de los sobrenadantes de las fermentaciones (1:1, 1:2, 1:10). También se determinó el IC<sub>50</sub> del captopril, utilizando las siguientes diluciones (1:10000, 1:100000 y 1:1000000), el valor obtenido fue comparado con el de la literatura. A cada una de las diluciones empleadas de la leche fermentada o el captopril se le determinó el grado de inhibición de la ACE. Posteriormente se graficaron los inversos del grado de inhibición de la ACE contra los inversos de la concentración de proteína, la cual fue medida por el método de Lowry y col. (1951); se construyó una gráfica de este tipo para cada fermentación a dos tiempos, 28 y 32 h a partir de las cuales se calculó el valor de IC<sub>50</sub> (Leclerc y col., 2002).

### **6.8. Prueba de estabilidad a las enzimas digestivas**

Se simuló el proceso de digestión gastrointestinal para conocer la estabilidad de los péptidos inhibidores de la ACE bajo tales condiciones. La hidrólisis se llevó a cabo de acuerdo a la metodología empleada por Hernández y col. (2004) con algunas modificaciones.

1. El pH de la muestra fue ajustado a un valor de 2 para llevar a cabo la hidrólisis con la pepsina (EC 3.4.4.1.; 863 unidades/mg proteína) (Sigma Aldrich) durante 90 minutos a 37°C.

2. La hidrólisis se detuvo por calentamiento a 95°C durante 10 minutos.
3. Posteriormente el pH de la muestra fue ajustado a un valor de 7.5 para llevar a cabo la hidrólisis con la tripsina (EC 3.4.21.4, 13816 unidades/mg proteína) (Sigma Aldrich) durante 240 minutos a 37°C.
4. La hidrólisis se detuvo por calentamiento a 95°C durante 10 minutos.
5. Las muestras fueron congeladas a -18 °C hasta su uso para la cuantificación del grado de inhibición de la ACE.

Nota: Todas las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo en una incubadora con control térmico con agitación constante de 200 rpm.

### **6.9. Determinación de fijación de hierro**

Se usó la metodología reportada por Hwang y col. (2001), la cual permite determinar la cantidad de hierro que fijan los hidrolizados protéicos obtenidos de la fermentación con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712. En esta técnica se utiliza un reactivo que permite cuantificar la cantidad de hierro en una solución, llamado ferrozina, el cual se une con el hierro formando un complejo de color magenta, que puede ser fácilmente determinado a una longitud de onda de 562 nm. La metodología empleada es la siguiente:

1. Se tomó 0.1 mL de muestra y se mezcló con 0.6 mL de agua desionizada. La mezcla se agitó vigorosamente.
2. Posteriormente a la mezcla anterior se le adicionó 0.1 mL de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0.2 mM)
3. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente por 30 segundos
4. Se agregaron 0.2 mL de ferrozina 1 mM (Sigma-Aldrich, USA).
5. La mezcla de reacción se agitó y se mantuvo por 10 minutos a temperatura ambiente
6. La absorbancia fue leída a 562 nm (contra agua desionizada). Se preparó un blanco que 0.7 mL de agua desionizada con 0.1 mL de  $\text{FeCl}_2$  (0.2 mM) y 0.2 mL de ferrozina.
7. El porcentaje de hierro ligado en las muestras se determinó con la siguiente fórmula

Donde:

$A_0$  = Absorbancia del blanco

$A_1$ = Absorbancia de la muestra

## **6.10. Determinación de fijación de calcio**

La metodología empleada para la determinación de fijación de calcio es la propuesta por Brown y Rydqvist (1981) con modificaciones. Para la medición del calcio se utilizó el reactivo de calcio arsenazo III, el cual reacciona con el calcio presente en la muestra formando un complejo de calcio arsenazo que es de color púrpura y se cuantifica a 650 nm. Se utilizó un estándar (0.1 mg/mL) de calcio para la realización de una curva patrón. Los pasos utilizados para la determinación de calcio ligado en las muestras fueron los siguientes:

1. Se mezclaron 2 mL de cloruro de calcio  $\text{CaCl}_2$  5 mM con 1 mL de muestra, la cual fue previamente diluida (1:10), en buffer de fosfatos con pH 8.0.
2. Para la determinación de calcio total en la muestra, se mezclaron 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla anterior con 1 mL del reactivo de calcio arsenazo III, se leyó la absorbancia a 650 nm contra un blanco de agua desionizada.
3. Para la determinación de calcio final se incubó la mezcla de cloruro de calcio y muestra durante 30 min con agitación de 100 rpm a 22°C.
4. Posteriormente se tomó una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  y se le adicionó 1 mL del reactivo de calcio arsenazo III, finalmente se midió la absorbancia a 650 nm.
5. Con los valores de las absorbancias y la curva patrón del estándar de calcio se calculó la concentración de calcio total y final. El calcio ligado por cada una de las muestras se obtuvo de la siguiente forma

Donde:

$C_0$ = Concentración de calcio total

$C_1$ = Concentración de calcio final

**Nota:** Todos los materiales que fueron utilizados en esta técnica fueron lavados con HCl 1N durante la noche anterior y antes de ser utilizados fueron enjuagados con agua desionizada para evitar que el material empleado tuviera calcio que pudiera interferir en las determinaciones.

## **6.11. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)**

### **6.11.1 Cromatografía de exclusión**

Este método se utilizó para conocer el perfil peptídico de las muestras de las fermentaciones y seleccionar las fracciones que presentaron un mayor grado de inhibición de la ACE. La cromatografía de HPLC utilizando una columna de exclusión molecular, permite separar las moléculas de acuerdo a su tamaño. La columna está compuesta de cuentas esféricas de gel con poros de un tamaño específico. Generalmente las partículas pequeñas se difunden mejor en los poros que las moléculas de mayor tamaño y por eso su tiempos de retención son más altos, en consecuencia las moléculas son eluidas en orden inverso a su peso molecular (Mine y Shahidi, 2006).

El equipo utilizado es un cromatógrafo de líquidos de alta resolución de marca Lab Alliance compuesto por una bomba, un desgasificador, un sistema de mezclado y un detector de arreglo de diodos UV-Visible (Spectra System UV6000 LP). La columna utilizada fue la BioSep SEC-S-2000 con un tamaño de 300 x 7.80 mm. Se utilizó un amortiguador de fosfatos 0.1 M a un pH de 6.8. EL flujo de trabajo fue de 0.9 mL/min. La presión de trabajo osciló entre 850 y 950 psi. Los cromatogramas se obtuvieron a tres longitudes de onda 215, 254 y 280 nm. Los programas utilizados fueron el Chrom Quest para controlar el flujo y el Lab Grad para la inyección.

### **6.11.2. HPLC en fase reversa**

En esta técnica, las moléculas que poseen algún carácter hidrofóbico, como las proteínas, péptidos y ácidos nucleicos, pueden ser separados con una excelente resolución. En la cromatografía en fase reversa se utilizan partículas de sílica modificadas químicamente con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos, como fase estacionaria. Esto convierte a la fase estacionaria en una matriz apolar, por lo que se emplean mezclas de solventes polares como agua, acetonitrilo, acetato de etilo, acetona y alcoholes alifáticos. Las moléculas son retenidas en la columna por medio de las interacciones hidrofóbicas que establecen con la sílica modificada. Estas interacciones hidrofóbicas son bastante débiles pero muy numerosas por lo que para poder eluir las moléculas es necesario disminuir la polaridad del disolvente; para ello se puede sustituir el agua de la fase móvil con un solvente orgánico cuya concentración se va aumentando gradualmente. Para la separación e

identificación de péptidos y aminoácidos la resina más empleada es una cadena lineal de 18 carbonos designada comúnmente como C18. La mezcla para analizar es aplicada a la columna en solución acuosa acidificada con ácido trifluoroacético. Para mejorar la solubilidad de los péptidos se le puede añadir al solvente un 10 a 20% de acetonitrilo.

El equipo utilizado fue el mismo especificado en la sección 6.11.1. La columna utilizada fue C18 Jupiter Su (18300 A). Se utilizaron dos soluciones de corrida, la solución A: 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua y la solución B: 0.1% TFA en acetonitrilo. El flujo de trabajo fue de 1.0 mL/min. La corrida fue de 40 minutos. La presión de trabajo osciló entre 1050 y 1300 psi. Los cromatogramas se obtuvieron a tres longitudes de ondas (215, 254 y 280 nm). Inyecciones utilizaron los mismos programas indicados en la sección 6.11.1. En la tabla 3 se muestra el gradiente utilizado:

**Tabla 3. Gradiente utilizado para la cromatografía en fase reversa**

<b>Tiempo de corrida (minutos)</b>	<b>% de Solución A</b>	<b>% de Solución B</b>
3	100	0
28	30	70
30	30	70
30.10	0	100
30.50	0	100
30.60	100	0
40	100	0

## **6.12. Análisis estadístico**

El análisis estadístico empleado para determinar si había diferencias significativas en la concentración de grupos amino libres, crecimiento microbiano, pH, concentración de péptidos menores a 10kDa (HPLC-exclusión), inhibición de la ACE y porcentaje de fijación de calcio y hierro en las fermentaciones con y sin control de pH fueron las pruebas de ANOVA ( $\alpha=0.05$ ) con el programa estadístico NCSS 2000 (Hintze, 2000). Se determinó la correlación entre el grado de proteólisis medido como la concentración de grupos amino libres y el porcentaje de inhibición de la ACE. Se midió también la correlación entre el valor de pH y el porcentaje de inhibición de la ACE en la fermentación sin control de pH. Se

***Efecto del pH sobre el perfil de péptidos potencialmente bioactivos producidos por Lactococcus lactis subsp. cremoris NCFB 712***

---

determinó la correlación entre el grado de proteólisis y la concentración de calcio o hierro fijado por las fermentaciones. Todas correlaciones fueron realizadas con ayuda del programa Excel 2007.

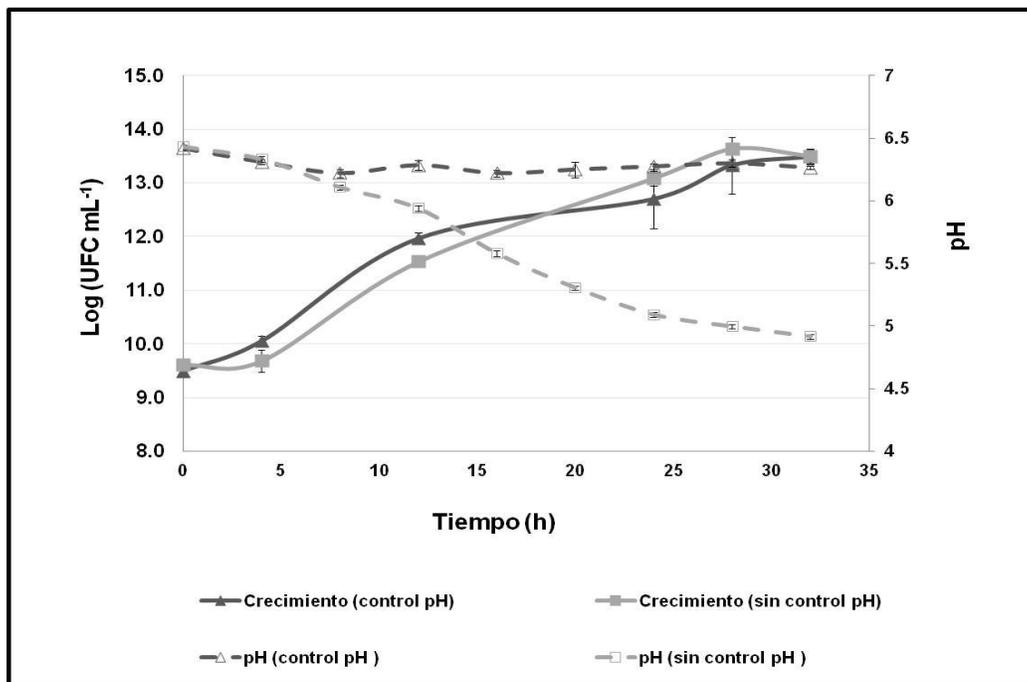
## **7. Resultados y discusión**

### **7.1. Determinación de crecimiento microbiano y monitoreo del pH durante las fermentaciones**

*Lactococcus lactis* es una bacteria ácido láctica comúnmente utilizada para la elaboración de algunos tipos de quesos como el Cheddar y el Mozzarella así como otros productos lácteos fermentados. Se determinó el crecimiento de *Lactococcus lactis* y los resultados obtenidos están en la Figura 10, se puede observar que el crecimiento en las fermentaciones con control de pH tiene dos fases, mientras que en la fermentación sin control de pH no se observa este comportamiento. Este crecimiento en dos fases fue reportado por Juillard y col. (1995) para *Lactococcus lactis* y demostraron que el microorganismo en sus primeras fases de crecimiento consume los aminoácidos y oligopéptidos que se encuentran disponibles en la leche y conforme va transcurriendo la fermentación estos se van agotando por lo que requiere utilizar su sistema proteolítico para hidrolizar las proteínas de la leche.

De acuerdo al análisis estadístico sólo existe diferencia significativa en el crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 entre las dos fermentaciones a las 12 h.

Con respecto a la variación del pH en la fermentación sin control de pH, se obtuvo un valor final de 5 debido a que *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 produce ácido láctico al degradar la lactosa presente en la leche. En la fermentación con control de pH, el valor de pH se mantuvo cercano a 6.2 durante toda la fermentación, ya que este es el valor de pH óptimo reportado para las proteinasas ligadas a pared celular de *Lactococcus lactis*.



**Figura 10. Crecimiento y evolución del pH durante las fermentaciones de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712.**

## 7.2. Generación de grupos amino libres durante las fermentaciones

Es bien conocido el hecho de que durante el proceso de fermentación de la leche, las proteínas son hidrolizadas por las proteinasas extracelulares de las bacterias ácido lácticas, lo cual puede llevar a un aumento en la concentración de grupos amino libres). Este efecto es claramente visible en la figura 11 en donde se observa el aumento de la concentración de grupos amino libres conforme transcurre el tiempo de fermentación, siendo mayor en la fermentación con control de pH. Las concentraciones máximas de grupos amino libres se alcanzaron durante las últimas horas de fermentación (28 y 32). El análisis estadístico nos muestra que empieza a existir diferencia significativa entre las dos fermentaciones desde la cuarta hora de fermentación. Además, es importante señalar de que esta diferencia significativa solo se observó en la concentración de grupos amino libres y no en el crecimiento de *Lactococcus lactis* durante las fermentaciones lo que sugiere que los resultados demuestran que la proteólisis es mayor en las fermentaciones con control de pH debido a que el valor de pH de esa fermentación se encuentra en un valor muy cercano al reportado para las proteinasas extracelulares de *Lactococcus lactis*. Estos resultados concuerdan con lo observado por LeBlanc y col. (2002), quienes reportaron que existía una

mayor proteólisis en una leche fermentada con *Lactobacillus helveticus* en la cual el pH se controlaba a un valor de 6.0 que en una leche fermentada con el mismo microorganismo pero sin control de pH, aunque no existiera diferencia significativa en el crecimiento de la bacteria durante las fermentaciones.

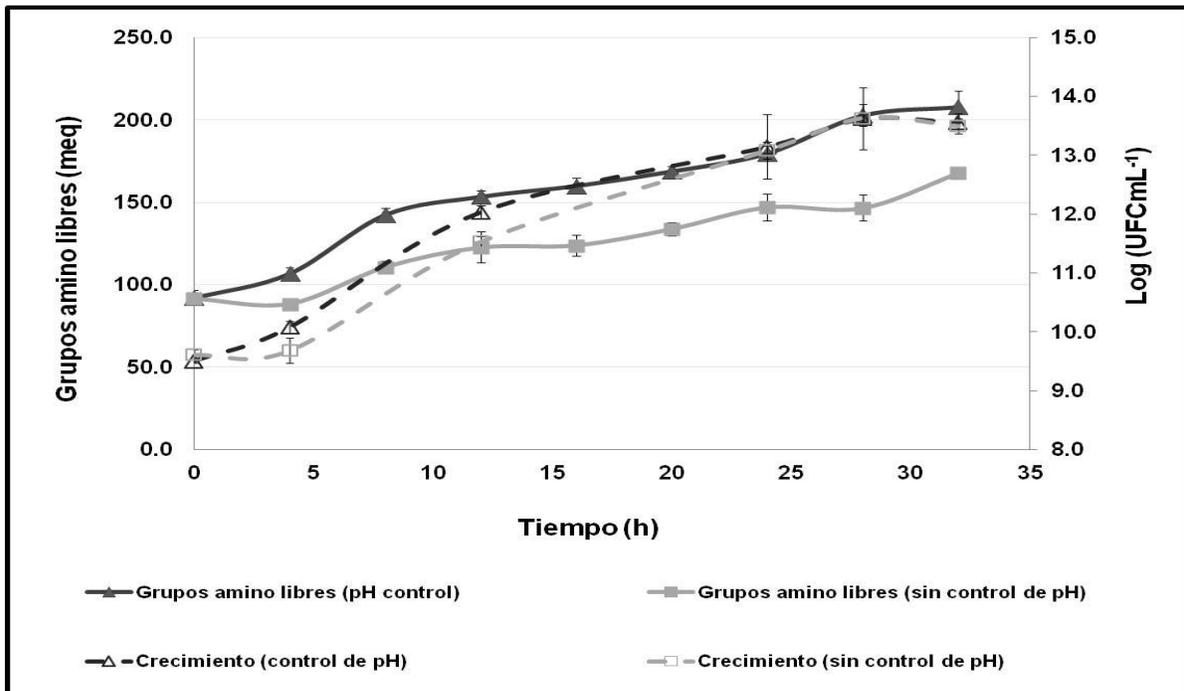
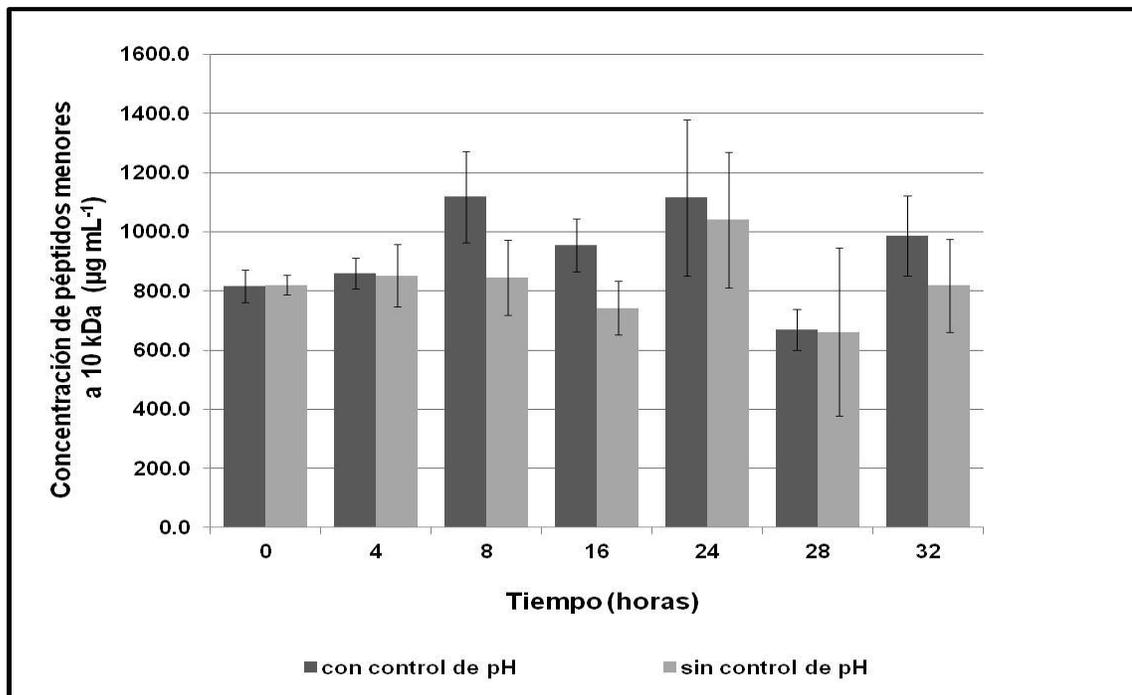


Figura 11. Concentración de grupos amino libres y crecimiento durante las fermentaciones de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712.

### 7.3. Perfil de péptidos obtenidos por cromatografía de exclusión molecular

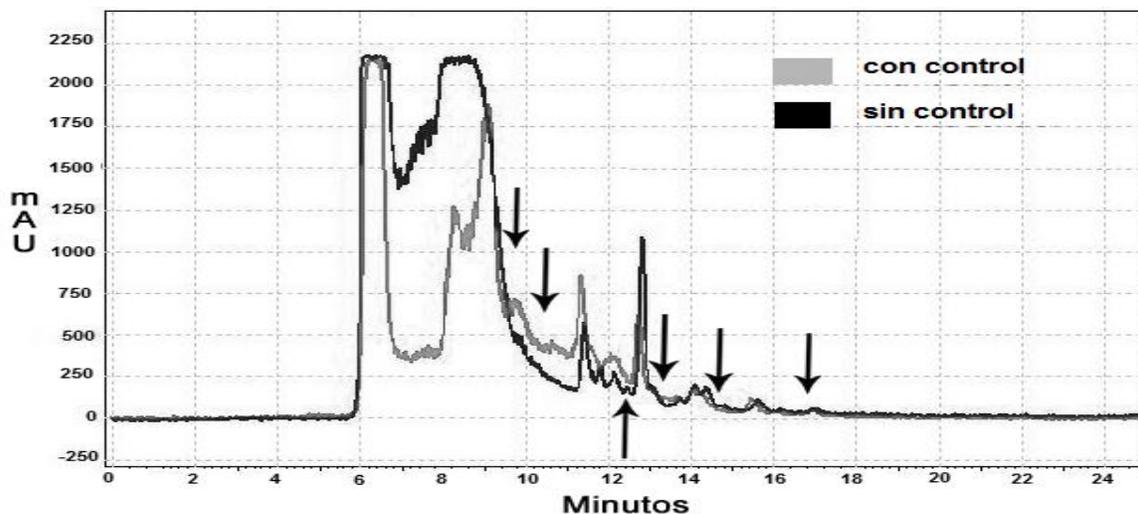
Se estimó el peso molecular y la concentración de los péptidos presentes en las fermentaciones por medio del análisis en HPLC por exclusión molecular. En la figura 12, se muestra la concentración de péptidos menores a 10 kDa en las fermentaciones, y se observa una mayor concentración de péptidos menores a 10 kDa en las fermentaciones con control del pH con respecto a la encontrada en las fermentaciones sin control de pH en la muestra de la hora 16, en los demás tiempos no se observan diferencias significativas en la concentración de péptidos producidos en las fermentaciones. En este gráfico también se observa una disminución en la concentración de péptidos a las 28 h, esto puede explicarse porque *Lactococcus lactis* se encuentra en la fase logarítmica tardía y se sabe que es

cuando la bacteria consume una mayor cantidad de péptidos derivados de la proteólisis de la leche (Niven y Mulholland, 1998).



**Figura 12. Concentración de péptidos menores a 10 kDa en las fermentaciones de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712.**

Se compararon los perfiles de los péptidos obtenidos en ambas fermentaciones. En el tiempo inicial las dos fermentaciones presentaron el mismo perfil de péptidos. Al igual que a las 4 h de fermentación, donde se observó que estos también presentaron un perfil similar. En estos tiempos de fermentación no hubo diferencia significativa en los valores del pH. A partir de la octava hora de fermentación, cuando se empiezan a observar diferencias en los perfiles de péptidos producidos en las fermentaciones (Figura 13), también se presenta una diferencia significativa del valor de pH entre ambas fermentaciones, por lo que se asume que el pH podría influir en la actividad proteolítica de algunas proteasas de *Lactococcus lactis* y por lo tanto producir una diferencia en la concentración y el tamaño de los péptidos obtenidos en las fermentaciones.

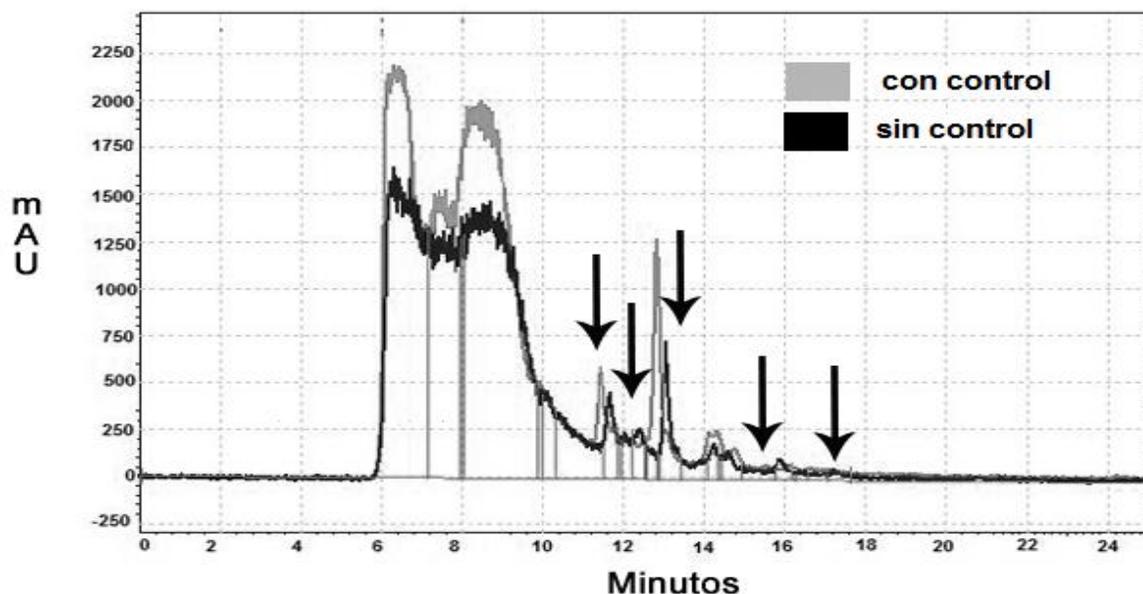


**Figura 13. Cromatogramas (a 215 nm) de las muestras obtenidas a 8 h de fermentación de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712, con y sin control de pH.**

En la Figura 14 se observan los cromatogramas obtenidos a las 32 h de ambas fermentaciones (Figura 14), con diferencias significativas entre los tamaños de los péptidos producidos. Estas diferencias en los perfiles peptídicos de las fermentaciones puede ser en parte explicado por el efecto del pH sobre la actividad de las proteinasas de *Lactococcus lactis*. Se sabe que el rango de pH óptimo para las proteinasas de pared celular de *Lactococcus lactis* se encuentra entre 6 a 6.4 (Kunji, y col., 1996). Esta enzima es la responsable de la degradación inicial de la caseína con el objetivo de formar oligopéptidos y en casos esporádicos algunos aminoácidos (Savijoki y col., 2006). En otras investigaciones se ha observado que se necesita de la acción proteolítica de otra proteasa (como las aminopeptidasas, las peptidasas específicas para prolina, dipeptidasas o tripeptidasas) además de la CEP, para poder satisfacer los requerimientos de nitrógeno del microorganismo (Crow y col., 1994). De hecho, se ha reportado una aminopeptidasa A (Pep A) en *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712, la cual se ha sugerido que está asociada a la membrana del microorganismo, dicha enzima es altamente específica para los residuos de Asp y Glu y tiene un pH óptimo de 8. Además, se han encontrado otras endopeptidasas como la Pep O, la Pep T y la X-prolildipeptidil (PepXP) en la pared celular de algunas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. El valor óptimo de pH para estas enzimas es 6.0, 5.8 y 7 (Monnet y col., 1993; Kunji y col., 1996). Hay que remarcar el hecho de que la Pep XP está involucrada en la hidrólisis de los oligopéptidos derivados de la caseína con alto contenido de Pro (Kok y de Vos, 1994; López-Fandiño y col., 2006). Además de que se ha

demostrado que la aminopeptidasa y la X-prolildipeptidil están involucradas en la generación de fragmentos con actividad inhibidora de la ACE (Pan y Guo, 2010).

Se sugiere que el pH de las fermentaciones puede tener un efecto en la actividad de algunas de las proteasas del sistema proteolítico de la bacteria, principalmente en las enzimas que tienen una localización extracelular o que se encuentran asociadas a la membrana. Por lo que durante el transcurso de la fermentación sin control de pH, la actividad de algunas proteasas podría verse afectada o inhibida, debido a la acidificación del medio por el metabolismo de *Lactococcus lactis* y esta podría ser la razón por la cual se observó una menor concentración de grupos aminos libres en la fermentación sin control de pH.



**Figura 14. Cromatogramas (a 215 nm) de las muestras obtenidas a 32 h de fermentación de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712, con y sin control de pH.**

Por otra parte, Kunji y col. (1996) reportaron que los péptidos de bajo peso molecular producidos intracelularmente por las endopeptidasas de las bacterias ácido lácticas pueden ser excretadas hacia la leche por algún tipo de intercambio de péptidos a nivel de la membrana celular o bien debido a la lisis celular. La lisis celular puede también permitir la salida de algunas peptidasas intracelulares hacia el medio de fermentación, las cuales pueden actuar sobre los oligopéptidos de gran tamaño derivados de la acción de la CEP sobre la caseína. Se ha observado que el pH del medio de fermentación puede inducir la lisis celular, en particular, los valores de pH cercanos a 6.6 aumentan la lisis mientras que valores más bajos retrasan ese proceso (Hannon y col., 2006). El proceso de lisis celular puede

afectar la tasa de proteólisis y el perfil de péptidos producidos. Además, se ha demostrado que *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* es más susceptible a la lisis que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Coolbear y col., 1994). Sin embargo, también se ha observado que no es necesaria la lisis celular para facilitar la salida de las proteasas intracelulares hacia el medio de fermentación debido a que existe un proceso de permeabilización bajo ciertas condiciones de la membrana, en el cual la célula permanece esencialmente intacta pero la integridad de su membrana se encuentra comprometida por lo que permite el paso de péptidos y algunas proteasas hacia el exterior (Niven, y Mulholland, 1998). Esta posible salida de péptidos y proteasas podría ocasionar diferencias en los perfiles peptídicos de las fermentaciones.

El efecto del pH sobre la CEP no sólo se limita a la tasa de proteólisis sino que también se ha observado que podría tener efecto sobre la especificidad de esta enzima, sobre todo cuando el microorganismo presenta una proteinasa de tipo I (CEP-I), que justamente es la que posee el microorganismo utilizado en el presente estudio. Exterkate y Alting (1993) mostraron que el patrón de hidrólisis de la CEP-I sobre el fragmento 1-23 de la  $\alpha_{s1}$ -CN era diferente dependiendo el pH del medio de fermentación, ya que cuando el pH estaba cercano a 6.5, la enzima hidrolizaba preferentemente los enlaces 8-9 (H-Q) y 9-10 (Q-G) mientras que cuando el medio de fermentación era más ácido (pH 5.2) la enzima prefería hidrolizar los enlaces 13-14 (Q-E), 16-17 (L-N) y 17-18 (N-E). Este efecto sobre la especificidad podría ser una buena explicación de las diferencias observadas en los perfiles peptídicos de las fermentaciones realizadas.

Los pesos moleculares de los péptidos producidos durante las fermentaciones (Tabla 4), oscilan entre los 9.69 y 0.23 kDa. En estudios realizados por Algaron y col. (2004), se había demostrado que una cepa silvestre de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* tiene la capacidad de generar secuencias peptídicas que contienen cuatro, tres y dos aminoácidos como algunas de las secuencias obtenidas en este trabajo.

Tabla 4. Pesos moleculares de los péptidos menores a 10 kDa presentes en las leches fermentadas (con y sin control de pH) con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 encontrados durante las fermentaciones.

Tiempo de fermentación (h)	Control de pH							Sin control de pH						
	0	4	8	16	24	28	32	0	4	8	16	24	28	32
Pesos moleculares de los péptidos encontrados (kDa)	9.21	9.10	9.58	9.53	9.47	9.03	8.58	9.17	9.12	9.23	9.69	9.45	8.45	8.46
	7.86	7.56	6.75	7.93	7.65	7.49	6.84	7.80	7.63	7.63	8.09	7.97	7.02	7.07
	6.26	6.61	4.99	6.67	6.30	6.02	6.05	6.31	6.53	6.56	6.83	6.71	5.93	5.90
	4.86	4.74	3.36	5.85	4.82	5.43	5.37	4.96	4.73	5.73	5.79	5.92	5.25	5.66
	2.60	2.96	2.72	4.92	3.13	4.46	4.47	2.55	3.09	4.82	5.08	4.87	4.39	5.31
	1.96	2.56	2.47	3.25	2.63	3.15	3.08	1.94	2.59	3.20	3.34	3.30	2.88	4.37
	1.33	1.34	1.38	2.79	2.30	2.55	2.63	1.31	1.34	2.67	2.85	2.79	2.48	2.53
	1.05	1.03	1.07	2.42	1.94	2.19	2.06	1.04	1.03	2.35	2.51	2.41	2.12	2.12
		0.73	0.71	2.05	1.22	1.17	1.51		0.67	1.74	2.02	1.34	1.17	1.38
			0.31	1.34	0.90	0.92	1.22			1.30	1.79	1.06	0.93	1.17
			0.17	1.06	0.71	0.70	0.96			0.98	1.40	0.72	0.75	0.93
				0.71	0.43		0.66			0.68	1.09	0.60	0.64	0.62
				0.49	0.35		0.44			0.51	0.85	0.40		0.51
				0.44	0.30		0.18			0.25	0.70	0.28		0.33
				0.30							0.46	0.23		
			0.20							0.31	0.19			

#### 7.4. Grado de inhibición de la ACE

Los péptidos antihipertensivos generalmente ejercen su efecto fisiológico por la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y en los últimos años han sido muy estudiados, debido a que la hipertensión es un problema de salud a nivel mundial. Se midió el grado de inhibición de la ACE que presentan los sobrenadantes de las fermentaciones (0, 8, 16, 24 y 28 h) con y sin control de pH (Figura 15).

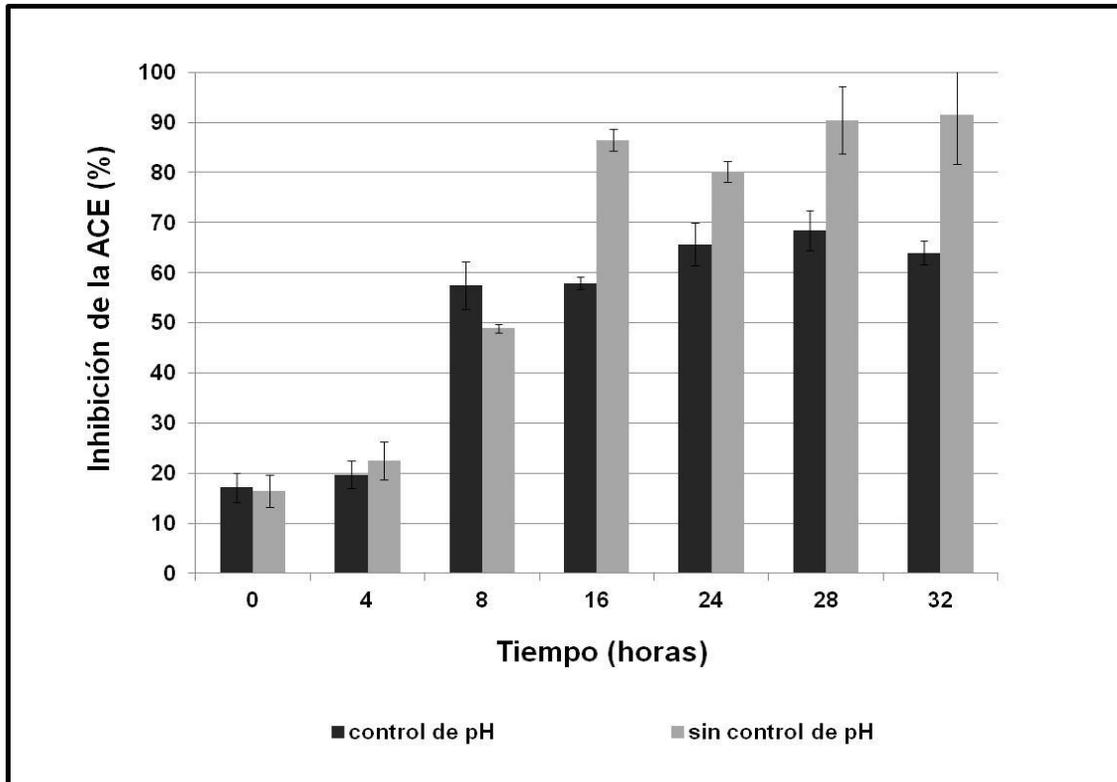


Figura 15. Inhibición de la ACE (%) durante las fermentaciones de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712, con y sin control de pH.

En la Figura 15 se puede observar un aumento en el grado de inhibición de la ACE conforme transcurre el tiempo de fermentación (en ambas fermentaciones), alcanzándose un grado de inhibición de la ACE del 90% en las fermentaciones sin control de pH y del 68 % en las fermentaciones con control de pH. El análisis estadístico nos indica que a partir de la octava hora de fermentación existe diferencia significativa en el porcentaje de inhibición de la ACE de las muestras analizadas. Esta diferencia en el porcentaje de inhibición de la ACE en

las dos fermentaciones realizadas podría deberse a la generación de diferentes fracciones peptídicas debido al cambio en la especificidad de la CEP-I por efecto del pH.

Se hizo la comparación entre la inhibición producida por el captopril (1 mg/mL) y la inhibición de la ACE de en las fermentaciones realizadas. El captopril, es uno de los inhibidores de la ACE más utilizado, con un 100% de inhibición. El porcentaje de inhibición de la ACE encontrada en las fermentaciones es menor que el observado en el captopril. Por ello, los hidrolizados presentan un alto potencial de ser utilizados como tratamiento preventivo de la hipertensión o bien para ser utilizarlos en conjunto con otros fármacos para el control de la presión arterial ya que no son tan potentes como los fármacos pero pueden disminuir algunos efectos secundarios causados por el uso de los fármacos para el control de la presión arterial.

En estudios realizados por Algaron y col. (2004) se demostró que las leches fermentadas durante 16 horas con *Lactococcus lactis* presentaban un porcentaje de inhibición de la ACE del 45 %, sin embargo, el grado de inhibición de la ACE fue determinado con otra técnica diferente, que utiliza como sustrato el furacriloil-prolil-glicil-glicina (FA-PGG) en lugar del hipuril- histidil- leucina (HHL).

Rodríguez y col. (2010) encontraron también que los extractos solubles de leches fermentadas con cepas de *Lactococcus lactis* aisladas de productos lácteos artesanales, presentaban actividades inhibitoras de la ACE elevadas (75 al 98%). La cuantificación de la actividad inhibitora de la ACE la realizaron con el método de Cushman y Cheung (1971).

Se compararon los pesos moleculares de los fragmentos obtenidos en las fermentaciones con los pesos moleculares de péptidos inhibidores de la ACE reportados (Tabla 5). Algunos de estos fragmentos también han sido encontrados en los extractos solubles de varios tipos de quesos como Gouda, Cheddar, Manchego y en leches fermentadas con diferentes bacterias ácido lácticas, como los fragmentos,  $\alpha$ 1-CN (1-9) y  $\alpha$ 1-CN (102-109). Se observa un mayor número de coincidencias con fragmentos inhibidores de la ACE en las fermentaciones realizadas sin control de pH, donde se encontró un mayor porcentaje de inhibición de la ACE.

Tabla 5. Comparación de los péptidos encontrados en las fermentaciones con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 con los péptidos inhibidores de la ACE reportados

Control de pH				
PM experimental (kDa)	PM reportado (kDa)	Secuencia reportada	IC <sub>50</sub> (μM)	Referencia
2.06	2.06	β-CN(58-76)	5.2	Hernández y col. 2011
1.38	1.38	β-CN(52-61)	25	Meisel y col. 2006
1.33	1.31	α <sub>S1</sub> -CN(25-34)	77	Hernández y col. 2011
1.22	1.21	β-CN(58-68)	27.9	Hernández y col. 2011
1.17	1.14	α <sub>S1</sub> -CN(1-9)	13.4	Hernández y col. 2011
1.03	1.03	β-CN(197-206)	137	Hernández y col. 2011
0.96	0.97	α <sub>S2</sub> -CN(25-34)	20.1	Hernández y col. 2011
0.92	0.90	α <sub>S1</sub> -CN(143-149)	6.6	Hernández y col. 2011
0.73	0.75	α <sub>S1</sub> -CN(104-109)	22	Hernández y col. 2011
0.70	0.69	β-CN(133-138)	5.5	Hernández y col. 2011
0.66	0.67	α <sub>S1</sub> -CN(90-94)	0.71	Hernández y col. 2011
0.49	0.50	α-LA(50-53)	733	Yamamoto y col. 1994
0.44	0.43	β-LG(142-145)	928	Hernández y col. 2011
0.35	0.32	β-CN(74-76)	5	Nakamura y col. 1995
0.30	0.30	β-LG(78-80)	141	Hernández y col. 2011
Sin control de pH				
PM experimental (kDa)	PM reportado (kDa)	Secuencia reportada	IC <sub>50</sub> (μM)	Referencia
2.12	2.06	β-CN(58-76)	5.2	Hernández y col. 2011
1.38	1.38	β-CN(52-61)	25	Meisel y col. 2006
1.30	1.31	α <sub>S1</sub> -CN(25-34)	77	Hernández y col. 2011
1.17	1.14	α <sub>S1</sub> -CN(1-9)	13.4	Hernández y col. 2011
1.09	1.09	β-CN(80-90)	141	Hernández y col. 2011
0.98	0.99	α <sub>S1</sub> -CN(102-109)	77.1	Hernández y col. 2011
0.93	0.94	β-CN(60-68)	14.8	Hernández y col. 2011
0.85	0.84	α <sub>S2</sub> -CN(189-193)	580	Hernández y col. 2011
0.75	0.75	α <sub>S1</sub> -CN(104-109)	22	Hernández y col. 2011
0.72	0.72	β-CN(169-174)	5	Hernández y col. 2011
0.70	0.69	β-CN(133-138)	5.5	Hernández y col. 2011
0.68	0.67	α <sub>S1</sub> -CN(90-94)	0.71	Hernández y col. 2011
0.64	0.65	κ-CN(61-66)	14.3	Hernández y col. 2011
0.51	0.50	α-LA(50-53)	733	Hernández y col. 2011
0.46	0.43	β-LG(142-145)	928	Hernández y col. 2011
0.98	0.99	α <sub>S1</sub> -CN(102-109)	77.1	Hernández y col. 2011
0.93	0.94	β-CN(60-68)	14.8	Hernández y col. 2011
0.85	0.84	α <sub>S2</sub> -CN(189-193)	580	Hernández y col. 2011

**Efecto del pH sobre el perfil de péptidos potencialmente bioactivos por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712**

0.75	0.75	$\alpha_{S1}$ -CN(104-109)	22	Hernández y col. 2011
0.72	0.72	$\beta$ -CN(169-174)	5	Hernández y col. 2011
0.70	0.69	$\beta$ -CN(133-138)	5.5	Hernández y col. 2011
0.68	0.67	$\alpha_{S1}$ -CN(90-94)	0.71	Hernández y col. 2011
0.64	0.65	$\kappa$ -CN(61-66)	14.3	Hernández y col. 2011
0.51	0.50	$\alpha$ -LA(50-53)	733	Hernández y col. 2011
0.46	0.43	$\beta$ -LG(142-145)	928	Hernández y col. 2011
0.40	0.40	$\kappa$ -CN(22-24)	15.7	Hernández y col. 2011
0.33	0.31	$\beta$ -CN(84-86)	9	Hernández y col. 2011
0.28	0.28	$\alpha_{S1}$ -CN(25-27)	2	Hernández y col. 2011
0.23	0.23	$\alpha$ -LA(50-51) y (18-19)	1522.6	Kayser y Meisel, 1996

Se ha reportado por otros autores que existe una correlación entre la actividad proteolítica y la producción de péptidos inhibidores de la ACE (Pihlanto y col., 2010), por ello, se determinó la relación existente entre la actividad proteolítica y el % de inhibición de la ACE, en las fermentaciones con y sin control de pH. Se encontró que en las dos fermentaciones estas dos variables tienen una alta correlación, (Figura 16). El coeficiente de correlación (r) entre la proteólisis y el porcentaje de inhibición de la ACE en la fermentación con control de pH es 0.923 mientras que para la fermentación sin control de pH es de 0.913. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Pihlanto y col. (2010) en donde encontraron una alta correlación entre el porcentaje de inhibición de la ACE y el grado de proteólisis en fermentaciones realizadas con diferentes cepas de lactobacilos.

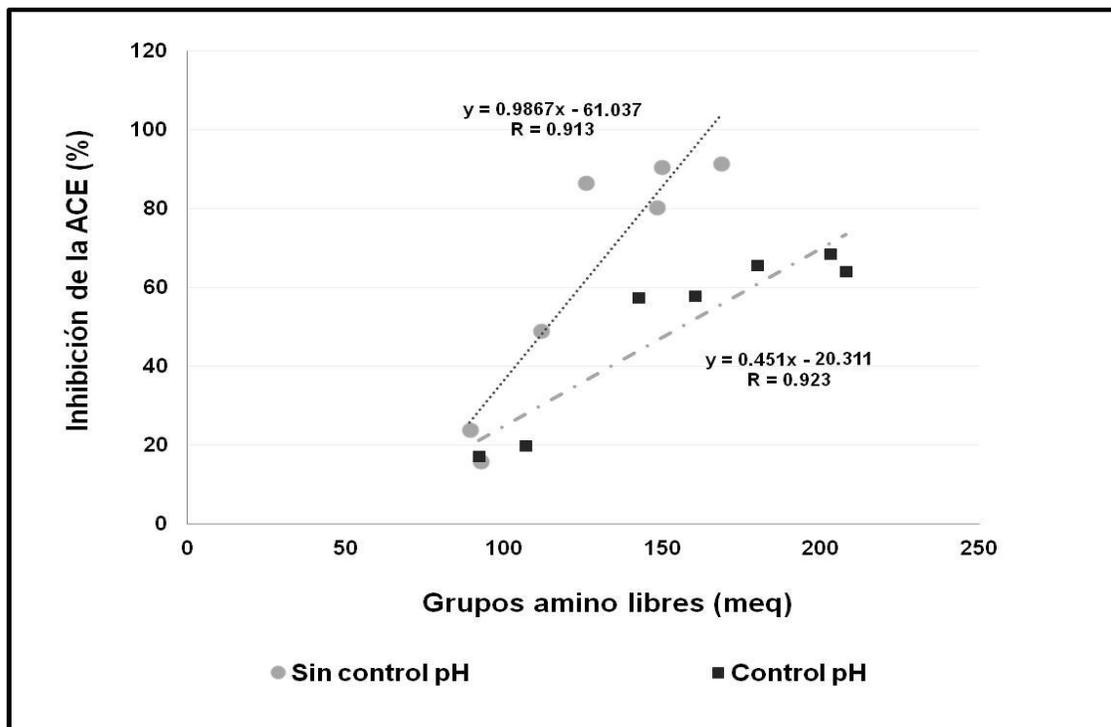


Figura 16. Correlación entre la actividad proteolítica y el % de inhibición de la ACE en las fermentaciones de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712.

También se observa que aunque las fermentaciones sin control de pH presentaron una menor actividad proteolítica, promovieron un mayor grado de inhibición de la ACE que las fermentaciones realizadas con control de pH. Esto concuerda con lo reportado por Guo y col. (2009), quienes hidrolizaron proteínas del suero de leche con la proteinasa de *L. helveticus* LB13 y se encontró que algunos hidrolizados que presentaban una menor actividad proteolítica, presentaban una actividad inhibidora de la ACE comparable o incluso mayor, que la obtenida con los hidrolizados que presentaban una hidrólisis mayor. De acuerdo a estos autores, lo anterior puede deberse a que los péptidos inhibidores de la ACE producidos en los primeros tiempos de fermentación pueden hidrolizarse en aminoácidos y péptidos más pequeños, los cuales pueden perder su actividad inhibidora de la ACE. Por lo tanto concluyen que las condiciones apropiadas para lograr un hidrolizado con un alto grado de inhibición de la ACE son diferentes a las condiciones adecuadas para lograr un alto grado de hidrólisis y que la tasa de hidrólisis no indica la evolución en la producción de péptidos inhibidores de la ACE.

### 7.5. Determinación del IC<sub>50</sub> de los péptidos generados por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712

El IC<sub>50</sub> nos indica la cantidad necesaria del péptido o hidrolizado para lograr la reducción en un 50% de la actividad de la ACE, en otras palabras nos indica la potencia del hidrolizado o péptido. Los valores de IC<sub>50</sub> se determinaron para los tiempos de fermentación 28 y 32 h, en ambas fermentaciones ya que fueron los tiempos en donde se encontró un mayor grado de inhibición de la ACE (Tabla 5). El IC<sub>50</sub> se obtiene al graficar los inversos de la concentración de proteína y el % de inhibición de la ACE. En la Figura 17 se observan los datos para la muestra obtenida a las 28 horas de la fermentación realizada con control de pH, se encontró un valor de IC<sub>50</sub> de 1670.7 µg/mL, este valor nos indica que se requieren tener 1670.7 µg/mL de esta muestra para inhibir en un 50% la actividad de la ACE. Las otras Figuras se muestran en los anexos.

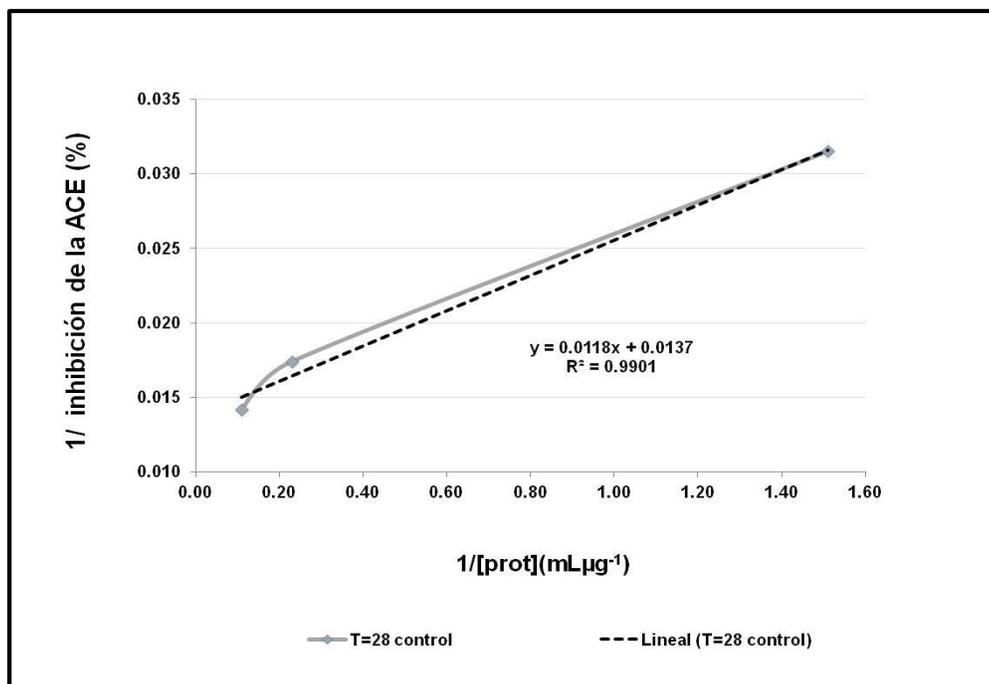


Figura 17. Determinación del IC<sub>50</sub> del sobrenadante obtenido a las 28 h de la fermentación con control de pH de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712.

En la Tabla 6 se reportan los valores de IC<sub>50</sub> de los sobrenadantes de las fermentaciones, y se observa que las fermentaciones realizadas sin control de pH tienen un menor IC<sub>50</sub> que las fermentaciones realizadas con control de pH, lo cual nos indica que se

requiere de una menor cantidad del sobrenadante de la fermentación sin control de pH para lograr una reducción del 50 % en la actividad de la ACE. Se confirmó también la efectividad del captopril ya que su valor de IC<sub>50</sub> es muy pequeño y se encontró un valor muy cercano (Tabla 6) al reportado por Duncan y col. (1999), lo cual nos indica que se tuvo una buena metodología para la determinación del IC<sub>50</sub>. Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por LeBlanc y col. (2002) cuyos valores de IC<sub>50</sub> están entre 600 y 1100 (µg/mL) en un hidrolizado de una leche fermentada con *Lactobacillus helveticus*.

**Tabla 6. Valores del IC<sub>50</sub> de los sobrenadantes de las fermentaciones de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712**

<b>Fermentación</b>	<b>Tiempo (h)</b>	<b>IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>
<b>Control de pH</b>	28	1670.73
	32	972.97
<b>Sin control de pH</b>	28	81.40
	32	68.18
<b>Captopril® reportado</b>		0.0039
<b>Captopril® obtenido</b>		0.0030

Se observó que el valor del pH es un factor importante en las fermentaciones realizadas debido a que mientras no hubo una diferencia significativa en el valor del pH en las fermentaciones como en los tiempos 0 y 4, no se presentaron diferencias ni en el perfil de péptidos producidos ni en el % de inhibición de la ACE. En contraste, al tener una diferencia significativa en el valor del pH (a partir de la octava hora de fermentación) empieza a observarse diferencias en el perfil de los péptidos producidos y en la actividad inhibidora de la ACE.

Esto puede atribuirse principalmente, al cambio de especificidad de la CEP-I por el efecto del cambio del pH durante la fermentación. Por estudios realizados sobre el fragmento 1-23 de la  $\alpha_{s1}$ -CN, se sabe que la CEP-I tiene una mayor afinidad por la hidrólisis de fragmentos péptidicos, en donde un aminoácido situado en el extremo amino presenta una densidad de carga positiva debido a que existía un mejor acoplamiento con el sitio de unión del sustrato (con carga negativa) de la proteinasa (Exterkate y Alting, 1993). Los aminoácidos arginina, lisina e histidina presentan una densidad de carga positiva, por lo que

al disminuir el pH del medio de fermentación podría presentarse una mayor probabilidad de hidrolizar fragmentos peptídicos con el extremo amino con alguno de estos aminoácidos. Además de que la lisina y la arginina, pueden contribuir con la potencia inhibidora de la ACE (Pripp y col., 2004; Jiang y col., 2010).

## **7.6. Determinación del grado de fijación del hierro**

Las deficiencias en micronutrientes, como los minerales traza ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , entre otros) pueden afectar a la mitad de la población mundial, se sabe que el 35% de los niños y el 42% de las mujeres presentan deficiencias de hierro y zinc, estas deficiencias producen algunos problemas de salud sobre todo, en el funcionamiento del sistema inmune (Bouglé y Bouhallab, 2006). Se ha visto que algunos hidrolizados derivados de alimentos, como el camarón y la soya, pueden fijar hierro y otros minerales. Aunque se ha logrado obtener secuencias peptídicas ricas en grupos seril-fosfato, que son las que permiten que se fijen los minerales, a partir de yogurt y otros productos lácteos fermentados (Lorenzen y Meisel, 2005), no se ha probado el grado de ligación de hierro de estos fragmentos. En este trabajo (Figura 18), se encontró que las fermentaciones realizadas con control de pH presentaron un mayor porcentaje de hierro fijado que las fermentaciones sin control de pH; al realizar el análisis estadístico se demostró que existen diferencias significativas entre ambas fermentaciones en cuanto a la concentración de hierro fijado a las 8, 16, 28 y 32 h.

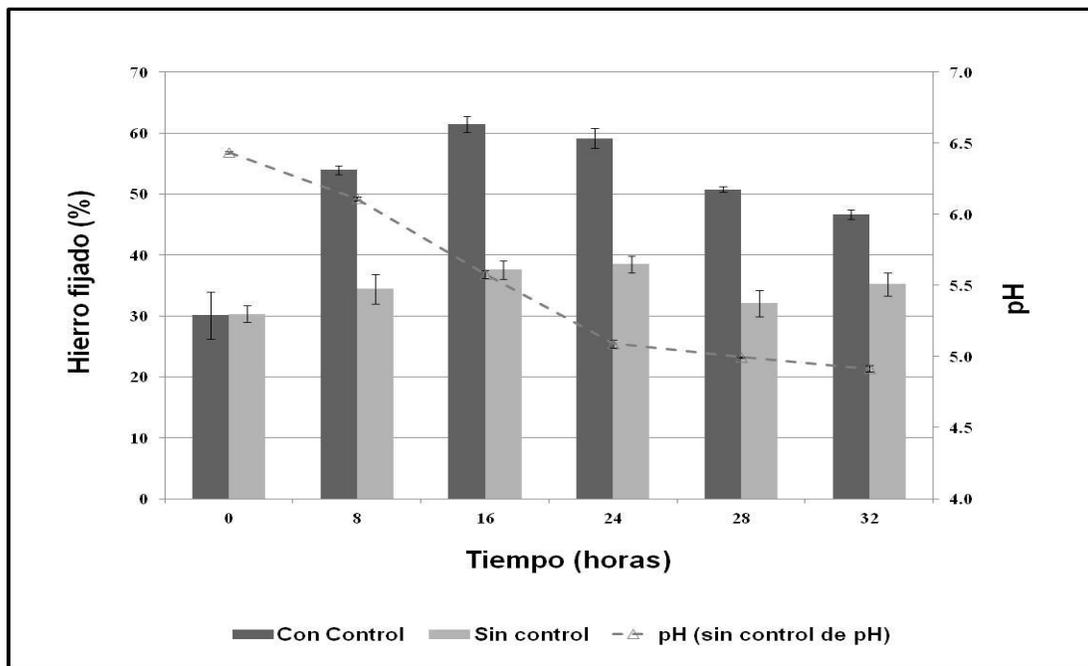


Figura 18. Porcentaje de hierro fijado en las fermentaciones con y sin control de pH realizadas con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712.

En esta figura también se observó un alto porcentaje de hierro fijado (30%) en las muestras de los primeros tiempos de las fermentaciones, posiblemente debido a que la leche contiene proteínas que tienen la capacidad de ligar hierro, como la  $\alpha$ -lactoalbumina, la  $\beta$ -lactoglobulina y la lactoferrina (Tong y col., 2000; Liu y col., 2005). Los porcentajes de hierro fijado máximos por las fermentaciones con control de pH y sin control de son 60 y 38 % respectivamente.

Existen pocos trabajos acerca de la capacidad de fijación de minerales por péptidos generados durante la fermentación o por la hidrólisis enzimática de las proteínas de leche, sin embargo en un trabajo realizado por Farvin y col. (2010) se demostró que las fracciones peptídicas del yogurt tenían hasta un 7.7% de capacidad de fijadora de hierro, aunque cabe señalar que utilizaron otra técnica para la determinación de hierro y la cantidad de proteína de los sobrenadantes utilizados era menor al encontrado en el presente estudio con *Lactococcus lactis*.

Liu y col. (2005) determinaron la capacidad fijadora de hierro de los sobrenadantes de las muestras obtenidas a diferentes tiempos durante la elaboración de kéfir con leche vaca y soya, con un contenido proteico de 10 mg/ mL. En este caso no se encontraron

incrementos significativos en la actividad fijadora de hierro de las muestras de kéfir cuando se compararon con las muestras sin fermentar (26%). Aunque no se puede comparar la actividad fijadora de hierro obtenida en los sobrenadantes del kéfir con la obtenida en los sobrenadantes las fermentaciones con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712, si se observa claramente que las fermentaciones con control de pH presentan una buena actividad fijadora de hierro, mientras que en las fermentaciones sin control de pH no se presentó este mismo comportamiento.

### **7.7. Determinación del grado de fijación de Calcio**

Alrededor del 99% del calcio total del cuerpo se encuentra en los huesos, el 1% restante se encuentra formando parte de otro tipo de células como las del sistema muscular. La deficiencia en la ingesta de calcio puede provocar el desarrollo de la osteoporosis. La osteoporosis se define como "una enfermedad esquelética sistémica, caracterizada por baja masa ósea y deterioro en la arquitectura del tejido óseo, que origina fragilidad ósea aumentada con el consecuente aumento en el riesgo de fractura". La osteoporosis es la causa más común de fracturas, afectando al 20% de las mujeres postmenopáusicas en EE.UU y se estima una población de 7.8 millones a nivel mundial y que el año 2040 el problema se habrá triplicado (Heaney, 2000). Es por ello que se buscan alternativas que reduzcan la pérdida del calcio en el sistema óseo. Se ha visto que existen secuencias peptídicas derivadas de diversas fuentes alimentarias que poseen la habilidad de fijar calcio. Se determinó el calcio que pueden ligar los sobrenadantes de las fermentaciones con y sin control de pH (Figura 19). Se encontró que los hidrolizados de las fermentaciones realizadas con control de pH pueden ligar más calcio que los hidrolizados de las fermentaciones realizadas sin control de pH. El análisis estadístico, permitió establecer que la cantidad de calcio fijado de los sobrenadantes de ambas fermentaciones es significativamente diferente a las 16, 24, 28 y 32 h. con respecto al valor inicial. La máxima concentración de calcio fijado fue 0.28 mmoles de  $\text{Ca}^{2+}$ /mg de proteína con el hidrolizado de la fermentación con control de pH, mientras que la máxima concentración de calcio fijado en la fermentación sin control de pH fue de 0.22 mmoles de  $\text{Ca}^{2+}$ /mg de proteína.

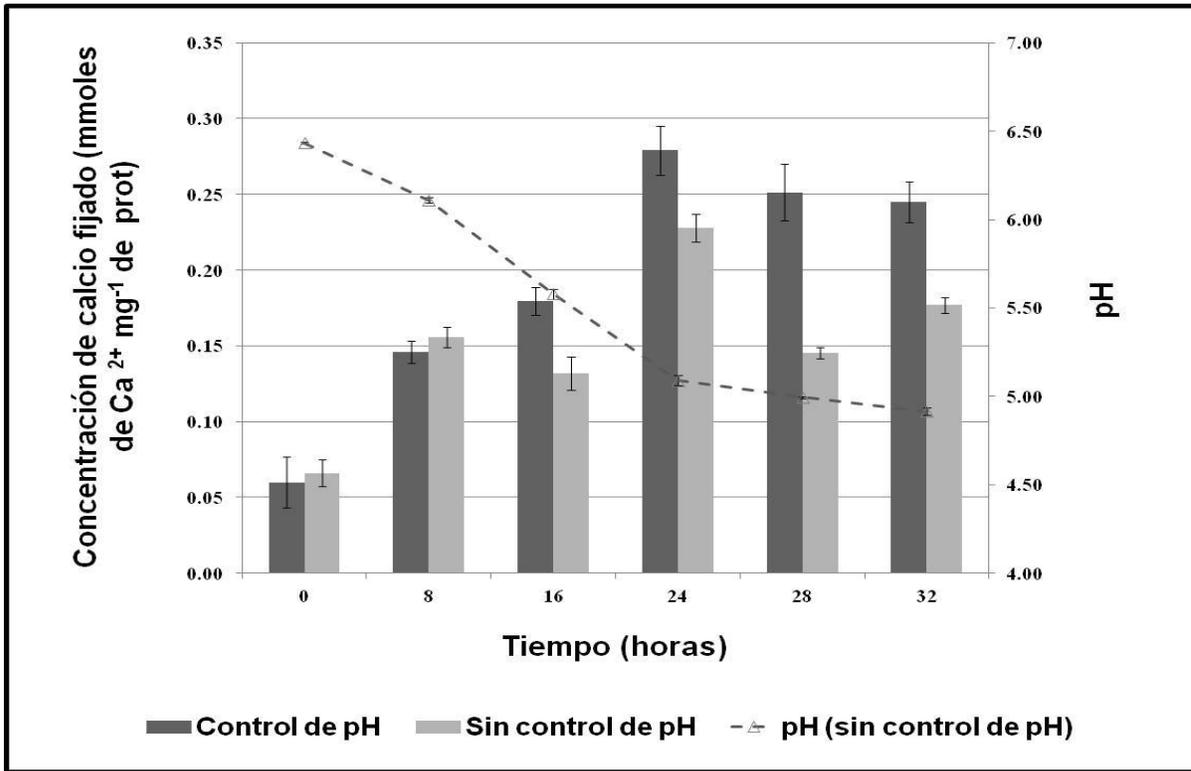


Figura 19. Concentración de Calcio fijado en las fermentaciones con y sin control de pH realizadas con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712.

En un trabajo realizado por Kim y Lim (2004) se encontró que se producen péptidos fijadores de calcio con pesos moleculares entre 3.4 y 1.4 kDa a partir del hidrolizado trípico de proteínas del suero de la leche. Al separar el hidrolizado en tres fracciones por medio de cromatografía de intercambio iónico utilizando un gradiente de NaCl cada fracción pudo fijar entre 0.1 a 2 mmoles de Ca<sup>2+</sup>/mg de proteína. Las concentraciones de calcio fijado en el presente trabajo en las muestras de fermentación con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 se encuentran dentro del rango de valores reportado.

Dimitrov (2009) reportó la capacidad fijadora de calcio de sobrenadantes ultrafiltrados de leches fermentadas de 210 cepas de bacterias lácticas; solo 20 cepas obtuvieron fracciones peptídicas con mayor capacidad de fijación de calcio, entre las que mostraron una mayor actividad estaban 8 de *Lactobacillus helveticus*, 5 de *Lactococcus lactis* y 3 de *Lactobacillus casei*. La mayor fijación fue de 20.68 mmoles de Ca<sup>2+</sup>/mL. Los resultados obtenidos en las fermentaciones realizadas con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712, van de 3.36 a

23.8 mmoles de  $\text{Ca}^{2+}$ /mL en la fermentación con control de pH y de 3.70 a 15.52 mmoles de  $\text{Ca}^{2+}$ /mL para la fermentación sin control de pH. Se observó que los valores máximos obtenidos de calcio fijado por los sobrenadantes de las fermentaciones con control de pH son muy similares al obtenido por la cepa de *Lactococcus lactis* que presentó una mayor fijación de calcio en el trabajo reportado por Dimitrov (2009).

Los pesos moleculares de las fracciones peptídicas determinados por HPLC fueron comparados con los pesos moleculares de péptidos reportados con actividad fijadora de minerales (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación de los péptidos encontrados en las fermentaciones con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 que coinciden con péptidos acarreadores de minerales reportados

Control de pH				
PM experimental (kDa)	PM reportado (kDa)	Secuencia reportada	Capacidad de fijación de minerales reportada	Referencia
3.13	3.11	$\beta$ -CN(1-25)-8P	4 mol de $\text{Fe}^{2+}$ mol de péptido <sup>-1</sup> , 2 mol de $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ mol de péptido <sup>-1</sup>	Meisel y Olieman, 1998, Vegarud y col. 2000, Zidane y col. 2011
2.79	2.71	$\alpha_{s1}$ -CN(59-79)-4P	6.84 $\pm$ 0.45 mol $\text{Ca}^{2+}$ mol de péptido <sup>-1</sup>	Cross y col., 2001, Aimutis, 2004, Cross y col. 2005
2.05	2.07	$\alpha_{s1}$ -CN(43-58)-2P	$\text{Ca}^{2+}$ y $\text{Fe}^{2+}$	Vegarud y col., 2000
1.06	1.01	$\beta$ -CN(15-20)-4P	6.2 mmoles de $\text{Ca}^{2+}$ mL <sup>-1</sup>	Dimitrov, 2009
0.71	0.67	$\beta$ -LG(78-83)	0.4 mmoles de $\text{Ca}^{2+}$ mg de proteína <sup>-1</sup>	Kim y Lim, (2004)
	0.69	$\alpha_{s2}$ -CN(29-34)-1P	$\text{Ca}^{2+}$	Aimutis, 2004
Sin control de pH				
PM experimental (kDa)	PM reportado (kDa)	Secuencia reportada	Capacidad de fijación de minerales reportada	Referencia
2.02	2.07	$\alpha_{s1}$ -CN(43-58)-2P	$\text{Ca}^{2+}$ y $\text{Fe}^{2+}$	Vegarud y col., 2000
1.06	1.01	$\beta$ -CN(15-20)-4P	6.2 mmoles de $\text{Ca}^{2+}$ /mL	Dimitrov, 2009
0.70	0.69	$\beta$ -LG(78-83)	0.4 mmoles de $\text{Ca}^{2+}$ mg de proteína <sup>-1</sup>	Kim y Lim, (2004)
	0.69	$\alpha_{s2}$ -CN(29-34)-1P	$\text{Ca}^{2+}$	Aimutis, 2004

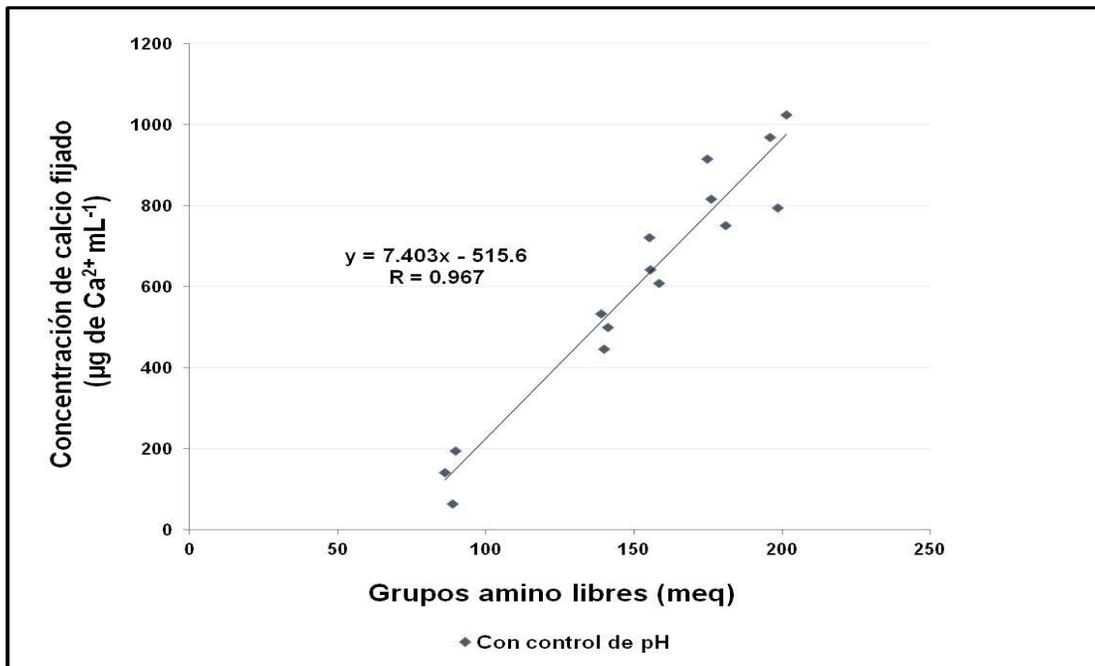
LG: Lactoglobulina, CN: Caseína

De todos los fragmentos derivados de la caseína que tienen la habilidad de fijar minerales divalentes, la fracción 1-25 de la  $\beta$ -CN es uno de los más estudiados. Este péptido

se ha logrado producir a través de la hidrólisis con tripsina de la caseína (Kitts, 2006) así como en muestras digeridas de queso Beaufort (Adt y col., 2011).

Se determinó la correlación entre la actividad proteolítica (medida por TNBS) y el calcio fijado (Figura 20 y 21), debido a que se ha reportado que puede existir una correlación entre la actividad proteolítica y la actividad biológica de los péptidos (Pihlanto y col., 2010). Se encontró una correlación de 0.967 para la fermentación con control de pH y de 0.830 para la fermentación sin control de pH. Esto es importante porque nos indica el grado de proteólisis requerido para generar las secuencias peptídicas que presentan una mayor actividad fijadora de calcio durante la fermentación.

De todos los fragmentos derivados de la caseína que tienen la habilidad de fijar minerales divalentes, la fracción 1-25 de la  $\beta$ -CN es uno de los más estudiados. Este péptido se ha logrado producir a través de la hidrólisis con tripsina de la caseína (Kitts, 2006) así como en muestras digeridas de queso Beaufort (Adt y col., 2011).



**Figura 20. Correlación de la actividad proteolítica con la concentración de calcio fijado ( $\mu\text{g de Ca}^{2+}/\text{mL}$ ) de los sobrenadantes de la fermentación con control de pH realizada con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712.**

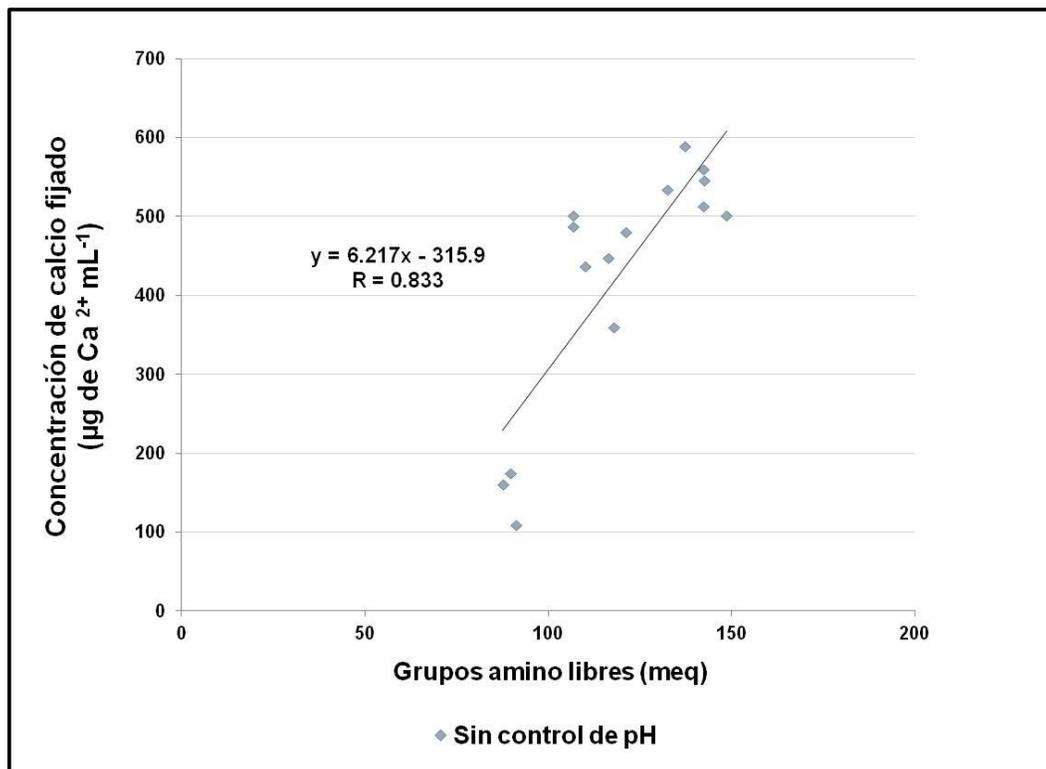
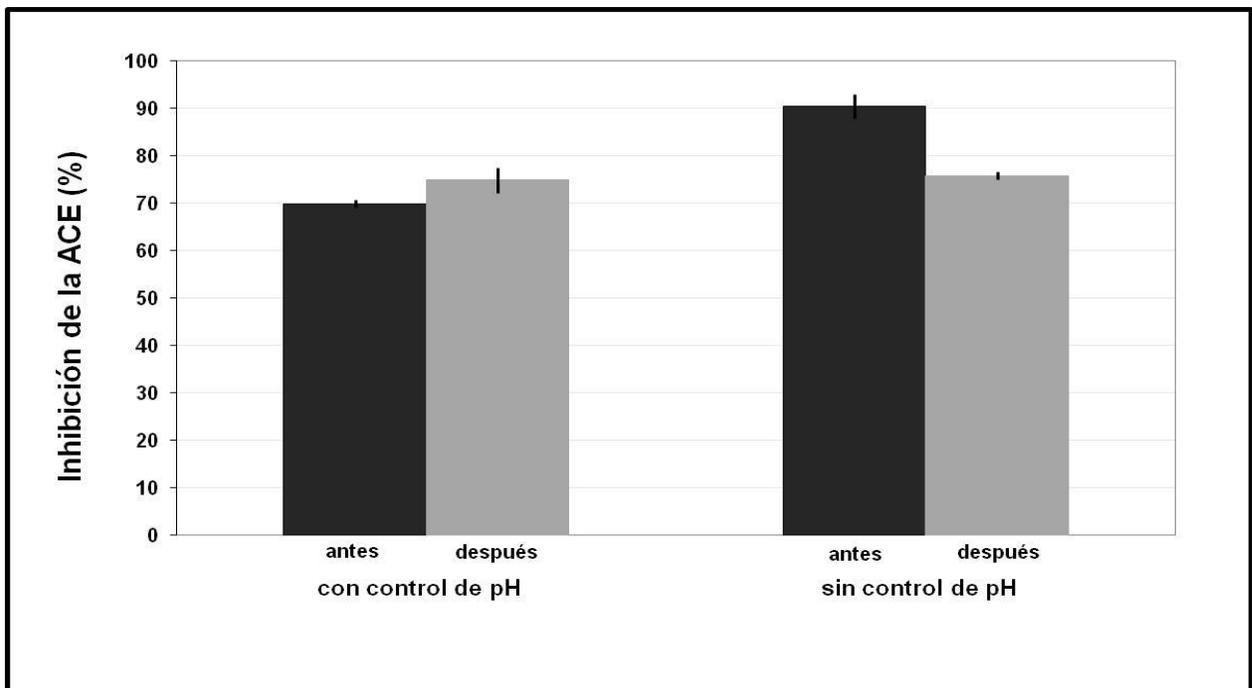


Figura 21. Correlación de la actividad proteolítica con la concentración de calcio fijado (µg de Ca<sup>2+</sup>/mL) de los sobrenadantes de la fermentación sin control de pH realizada con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712.

### 7.8. Estabilidad a las enzimas digestivas

La prueba de estabilidad ante la acción enzimática de la pepsina y tripsina se realizó con las muestras de las 32 h de ambas fermentaciones. Después de la digestión se observó que los péptidos de la fermentación con control de pH presentaron una mayor resistencia al proceso de digestión que los péptidos de la fermentación sin control de pH, ya que en esta última se observó una disminución del 14% de la inhibición de la ACE, esto puede deberse a que se degradaron fragmentos peptídicos de mayor tamaño que poseían esa actividad a péptidos de menor tamaño que no presentaban la actividad o tenían una actividad menor que el fragmento peptídico original producido durante la fermentación (Figura 22). Este comportamiento es muy importante debido a que los péptidos potencialmente bioactivos deben de resistir el proceso de digestión enzimática para poder llegar intactos al intestino delgado y ejercer su efecto. Se sabe que la mayor parte de los péptidos con peso molecular bajo resisten el proceso de digestión enzimática (Roufik y col., 2006). Aunque se perdió parte

de la actividad original de la ACE en el digerido de la fermentación sin control de pH, se conservó la mayor parte de la actividad de la ACE en los digeridos de ambas fermentaciones por lo que se podría inferir que la mayor parte de la actividad de la ACE está dada por péptidos pequeños aunque tampoco se descarta la actividad inhibitoria de fragmentos de mayor tamaño.



**Figura 22. Estabilidad frente a la acción de la tripsina y la pepsina de los sobrenadantes obtenidos a 32 h de fermentación.**

Al obtener el perfil peptídico de los digeridos de las dos fermentaciones por medio de cromatografía de exclusión, para determinar que fracciones peptídicas conservaron su peso molecular, se observó que aunque la fermentación sin control de pH presentó un menor grado de inhibición de la ACE después de la simulación de la digestión gastrointestinal, posee un mayor número de fracciones peptídicas que resistieron este proceso; tres de estas fracciones peptídicas tienen un peso molecular menor a los 1.6 kDa, mientras que otras dos fracciones que también presentaron estabilidad a la acción enzimática de la pepsina y tripsina tienen un peso de 2.16 y 4.35 kDa (Tabla 8). En cuanto a la fermentación con control de pH se observó que sólo los fragmentos correspondientes a 1.59 y 0.42 kDa resistieron el proceso de digestión enzimática. Roufik y col. (2006) realizaron un estudio de la

susceptibilidad a la acción proteolítica de las enzimas gastrointestinales de péptidos de bajo y alto peso molecular derivados de la  $\beta$ -lactoglobulina, del cual concluyeron que los péptidos con bajo peso molecular podrían conservarse durante el proceso de digestión intestinal mientras que los péptidos de mayor tamaño podrían hidrolizarse y por lo tanto necesitaban ser “protegidos” de las enzimas digestivas.

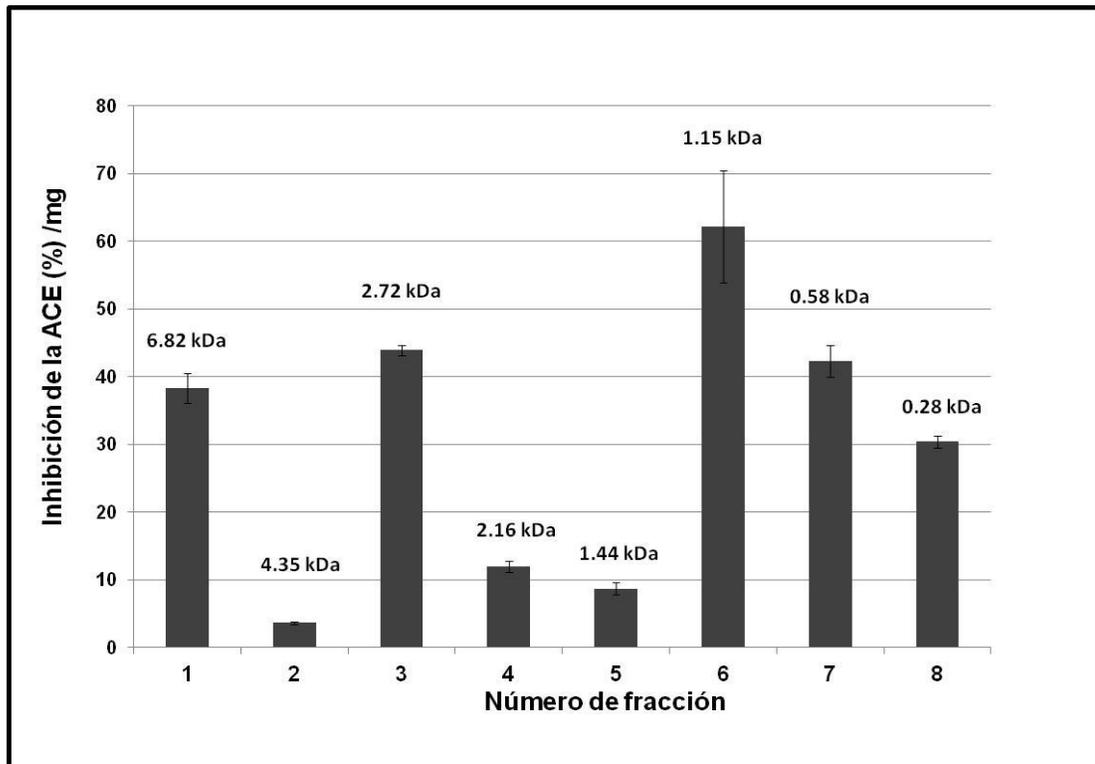
**Tabla 8. Pesos moleculares de los péptidos antes y después de la digestión con tripsina y pepsina**

Control de pH		Sin control de pH	
Pesos moleculares (kDa)			
Antes de la digestión	Después de la digestión	Antes de la digestión	Después de la digestión
8.58	7.95	8.46	
6.84		7.07	6.82
6.05		5.90	
5.37	5.44	5.66	
4.47	3.41	5.31	
3.08	2.86	4.37	4.35
2.63		2.53	2.72
2.06		2.12	2.16
1.51	1.60	1.38	1.44
1.22		1.17	1.15
0.96	0.79	0.93	
0.66		0.62	0.58
0.44	0.42	0.51	
0.18		0.33	0.28

### **7.9. Fraccionamiento del digerido del sobrenadante de 32 h de la fermentación sin control de pH**

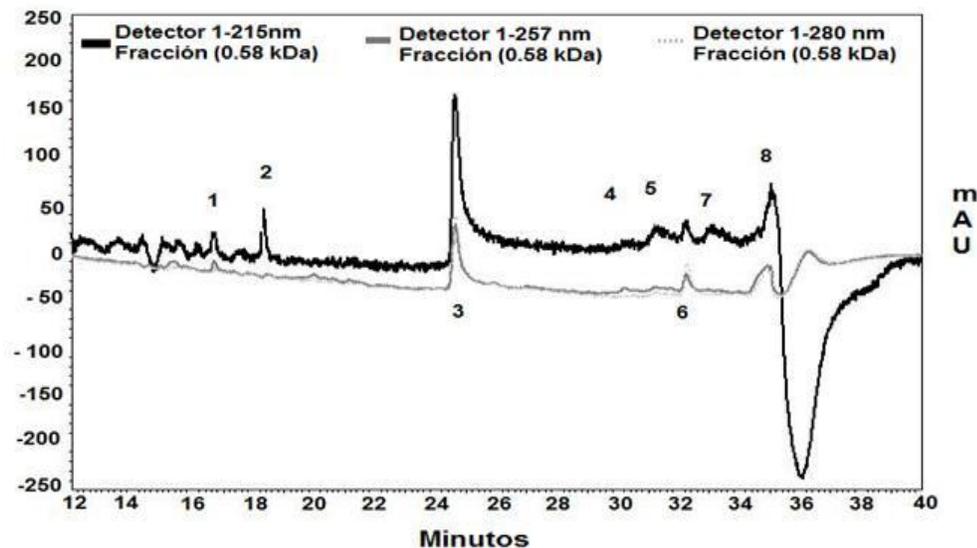
Posteriormente, se recolectaron por medio de cromatografía de exclusión los fragmentos péptidicos encontrados en los digeridos de la fermentación sin control de pH para poder estimar el peso molecular de los fragmentos que presentaron una mayor resistencia a la digestión con pepsina y tripsina. A cada una de las fracciones se le realizó la prueba de inhibición de la ACE (Figura 23). En este gráfico se observa que las fracciones correspondientes a los pesos moleculares de 4.35, 2.16 y 1.44 kDa, presentaron una

actividad inhibidora de la ACE /mg menor que el resto de las fracciones analizadas. La fracción peptídica con un peso molecular aproximado de 1.15 kDa presentó la mayor actividad inhibidora de la ACE/mg. Las fracciones peptídicas de 6.82, 2.72 y 0.58 kDa exhibieron una actividad inhibidora de la ACE/ mg similar entre sí.



**Figura 23. Actividad inhibidora de la ACE de las fracciones del digerido del tiempo 32 de la fermentación sin control de pH de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712.**

Las fracciones peptídicas correspondientes a los pesos moleculares 1.15, 0.58 y 0.28 kDa obtenidas por la cromatografía de exclusión fueron analizadas por cromatografía en fase reversa para comprobar si se trataba de un solo péptido o una mezcla de péptidos, así como para poder determinar la actividad inhibidora de la ACE de cada uno de los fragmentos aislados. Esta separación se da de acuerdo a su afinidad con el gradiente de acetonitrilo empleado. El cromatograma correspondiente a la fracción peptídica de 0.58 kDa se muestra en el Figura 24, donde se obtuvieron 8 péptidos. Las dos fracciones restantes también fueron analizadas por cromatografía en fase reversa, lo que dio como resultado 7 péptidos en cada una de ellas.



**Figura 25. Cromatograma de la fracción peptídica de 0.58 KDa (fracción 7) en fase reversa.**

Se determinó la actividad inhibidora de la ACE/ $\mu\text{g}$  a cada uno de los péptidos obtenidos, (Figura 26), se observa que los fragmentos peptídicos analizados tuvieron actividades inhibidoras de la ACE/ $\mu\text{g}$  que van desde 0.8 hasta 7.78; aunque la mayoría de los péptidos exhibieron actividades inhibidoras de la ACE/ $\mu\text{g}$  entre 2.4 a 3.6. Los péptidos 1, 2 y 4 de la fracción correspondiente a 0.58 kDa presentaron las mayores actividades de la ACE/ $\mu\text{g}$ . El péptido inhibidor de la ACE derivado de la leche reportado con mayor actividad de la ACE/ $\mu\text{g}$  es el tripéptido VAP (0.28kDa), con un valor de 6.9 (Mine y Shadidi, 2006).

Por otra parte, el valor del  $\text{IC}_{50}$  obtenido para las muestras de la fermentación sin control de pH durante la hora 32 (68.18  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) se debe a las altas actividades inhibidoras de la ACE/ $\mu\text{g}$  encontradas en las fracciones obtenidas mediante HPLC-fase reversa para ese tiempo de fermentación. La gran capacidad que presenta este microorganismo para la generación de péptidos con actividad inhibidora de la ACE puede ser atribuida a la alta actividad inhibidora de la ACE de las fracciones encontradas a la hora 32.

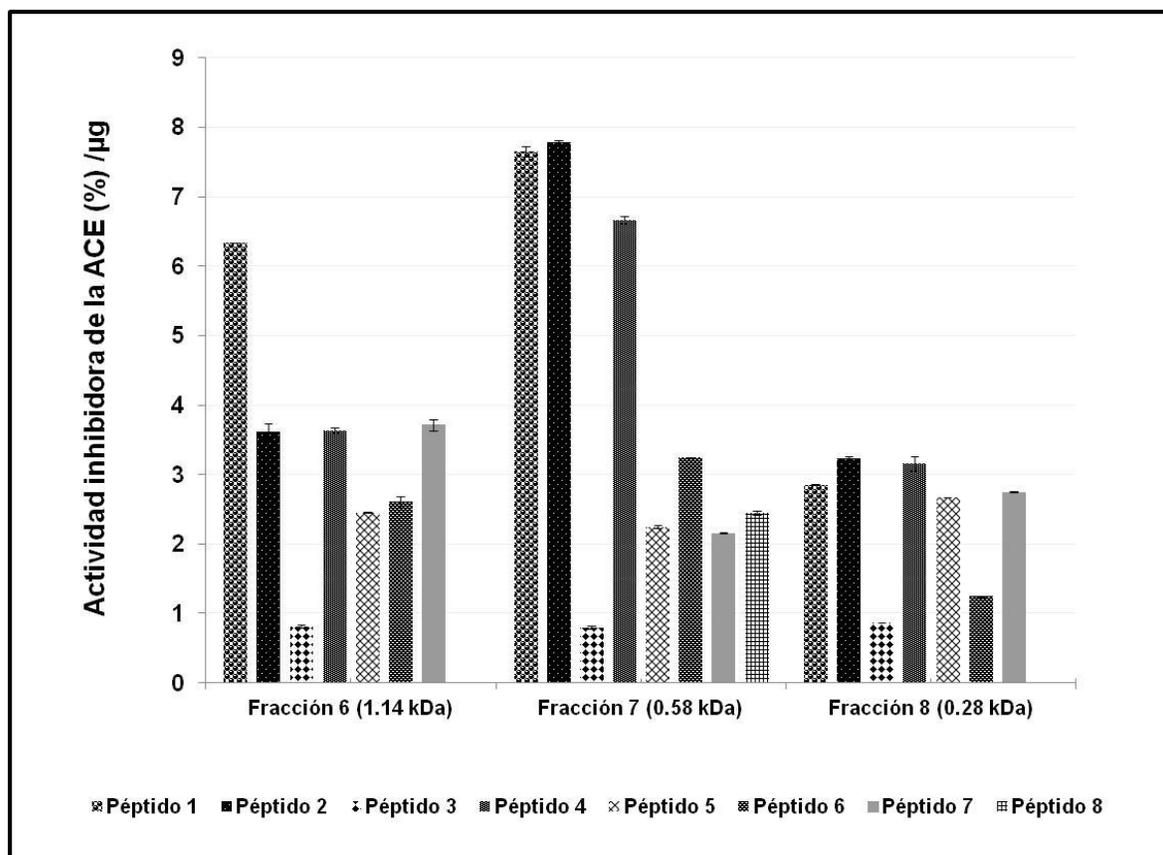


Figura 26. Actividad inhibidora de la ACE/ $\mu\text{g}$  de los péptidos encontrados en las fracciones peptídicas de 1.14, 0.58 y 0.28 kDa (fracciones 6, 7 y 8).

## **8.-Conclusiones**

- Se observó una mayor proteólisis en las fermentaciones realizadas con control de pH, aún cuando no existe diferencia significativa en el crecimiento de *Lactococcus lactis*. Las fermentaciones mostraron perfiles de péptidos diferentes a partir de las 8 h, que es cuando el pH de las fermentaciones empieza a ser diferente, sugiriendo que el pH tiene un efecto en el perfil de los péptidos producidos. Se ha visto que la especificidad de la CEP-I (proteínasa específica de la filogenia a la que pertenece la cepa de *Lactococcus lactis* NCFB 712) puede cambiar al disminuir el pH, aumentando la posibilidad de que se den más cortes en fragmentos peptídicos con extremos aminos con Lys y Arg, además de que se ha visto que existen menos cortes al acidificar el medio de fermentación que cuando existe un valor de pH más elevado (6.5).
- La cepa utilizada tiene la capacidad de generar péptidos antihipertensivos, con una mayor actividad en los hidrolizados obtenidos de la fermentación sin control de pH.
- El IC<sub>50</sub> es mayor en las fermentaciones con control de pH, sugiriendo que en esta fermentación se produjeron péptidos más potentes. Esto se confirma al analizar las fracciones en fase reversa, en donde se obtuvieron actividades inhibitorias relativas muy altas con respecto a las reportadas para otros péptidos.
- Los péptidos obtenidos en las fermentaciones realizadas con control de pH conservaron mejor su actividad inhibitoria de la ACE después de la digestión.
- Se observó que los fragmentos peptídicos con menor peso molecular resistieron el proceso de digestión enzimática con pepsina y tripsina, sin embargo se encontró que un péptido de 4.37 kDa resistió a la digestión.
- Se obtuvieron una gran cantidad de péptidos que presentan un elevado porcentaje de inhibición de la ACE/ $\mu\text{g}$  a partir de los digeridos analizados, además los valores obtenidos son comparables con los péptidos antihipertensivos más potentes reportados para leches fermentadas.
- Aun cuando no se puede confirmar la secuencia de los péptidos encontrados en las fracciones que presentaron una mayor inhibición de la ACE, se encontraron similitudes en el PM de péptidos reportados en leches fermentadas y quesos, además de que algunos segmentos peptídicos también muestran estabilidad hacia el ataque de las enzimas digestivas.

- Las muestras de la fermentación con control de pH mostraron una mayor capacidad de fijar el hierro y el calcio mientras que las muestras de la fermentación sin control de pH sólo tienen la capacidad de fijar calcio pero en menor proporción que el fijado por las fermentaciones con control de pH.

## 9.- Anexos

### 9.1. Figura de la curva para la determinación de la concentración de los péptidos encontrados por HPLC

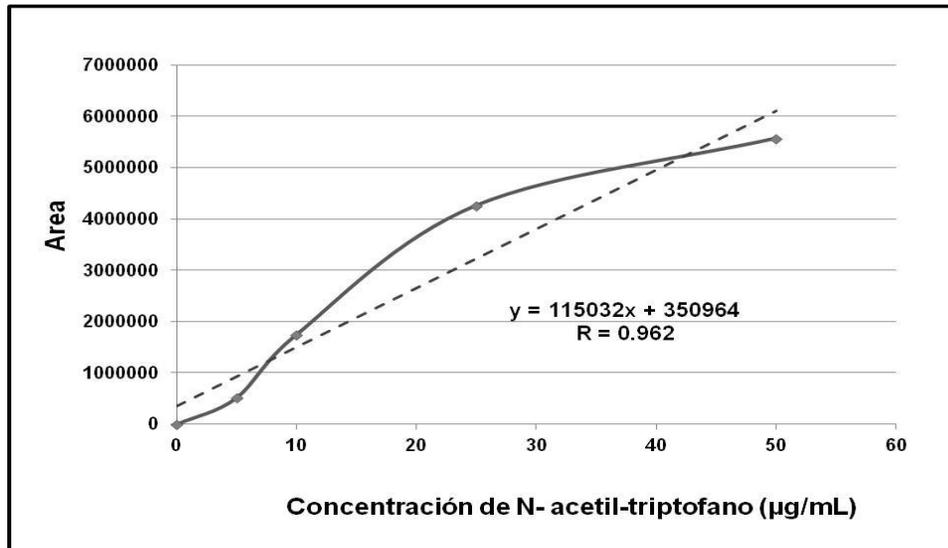


Figura. Curva patrón de concentración de N-acetil-triptófano para la determinación de la concentración de péptidos encontrados por HPLC

### 9.2. Figura de la curva para la determinación del peso molecular de los péptidos encontrados por HPLC

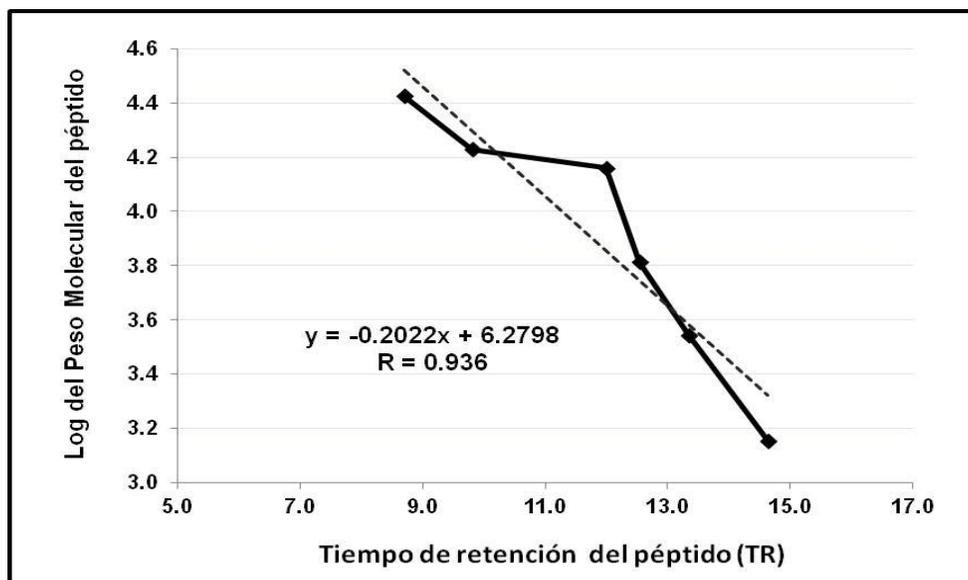


Figura. Curva patrón de Estándar de polipéptidos de BIORAD (BIORAD, USA) para la determinación del peso molecular de los péptidos encontrados por HPLC

### 9.3 Figuras realizadas para la determinación del IC<sub>50</sub> de las fermentaciones

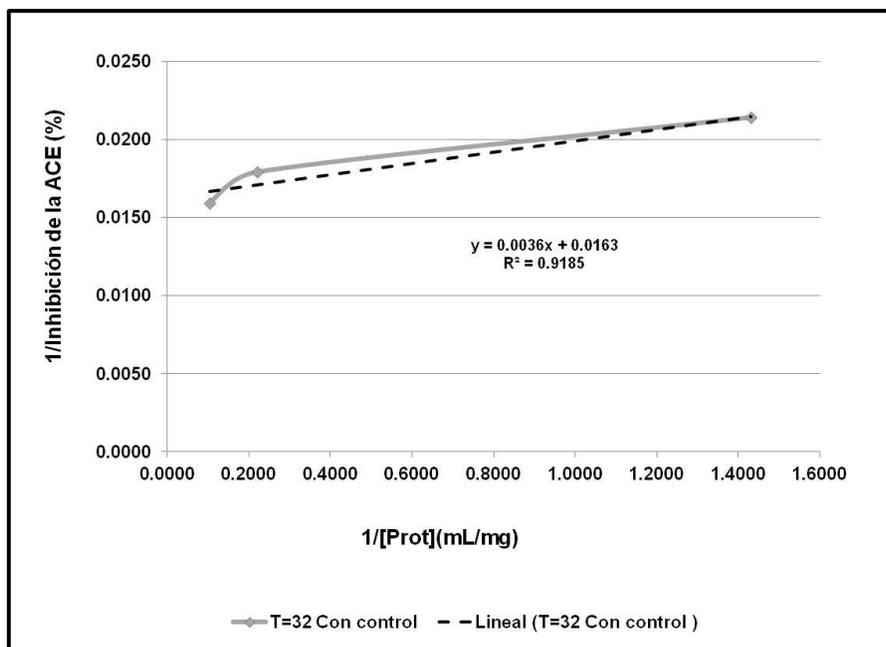


Figura . Determinación del IC<sub>50</sub> del sobrenadante obtenido a las 32 h de la fermentación con control de pH de *Lactococcus lactis* subs. *cremoris* NCFB 712.

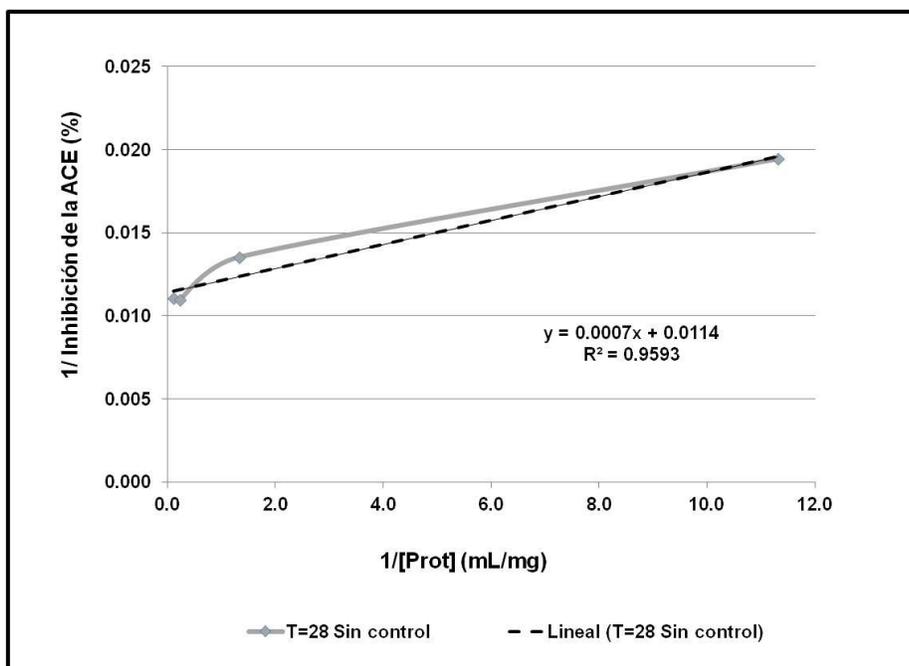


Figura. Determinación del IC<sub>50</sub> del sobrenadante obtenido a las 28 h de la fermentación sin control de pH de *Lactococcus lactis* subs. *cremoris* NCFB 712.

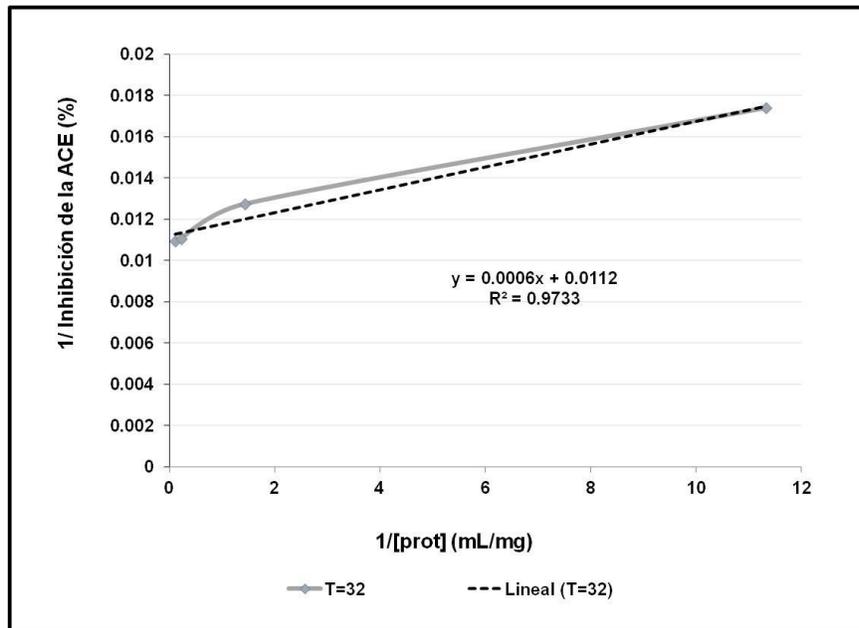


Figura. Determinación del  $IC_{50}$  del sobrenadante obtenido a las 32 h de la fermentación sin control de pH de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712.

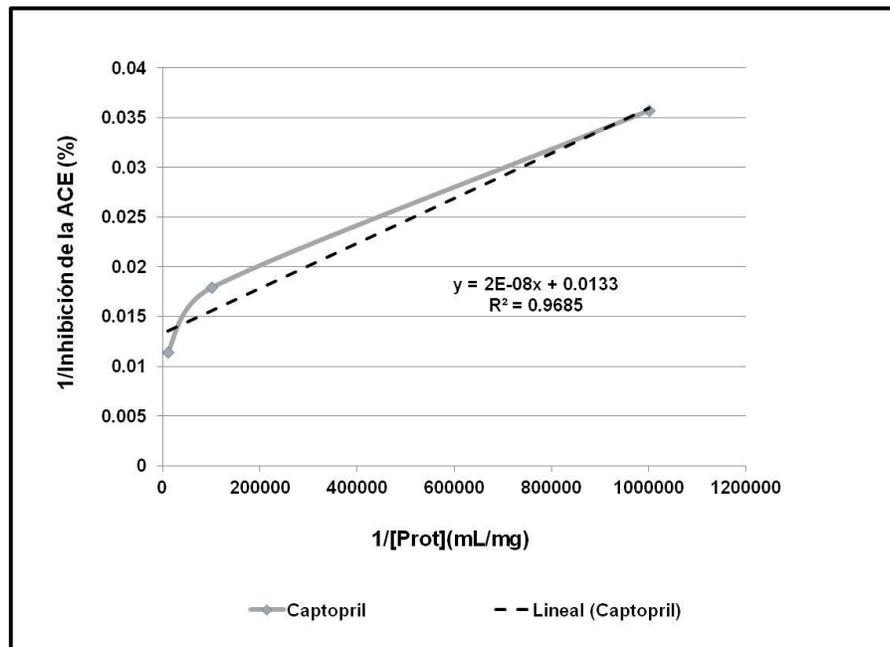


Figura. Determinación del  $IC_{50}$  del captopril®

#### 9.4. Figura de la Curva patrón de Calcio

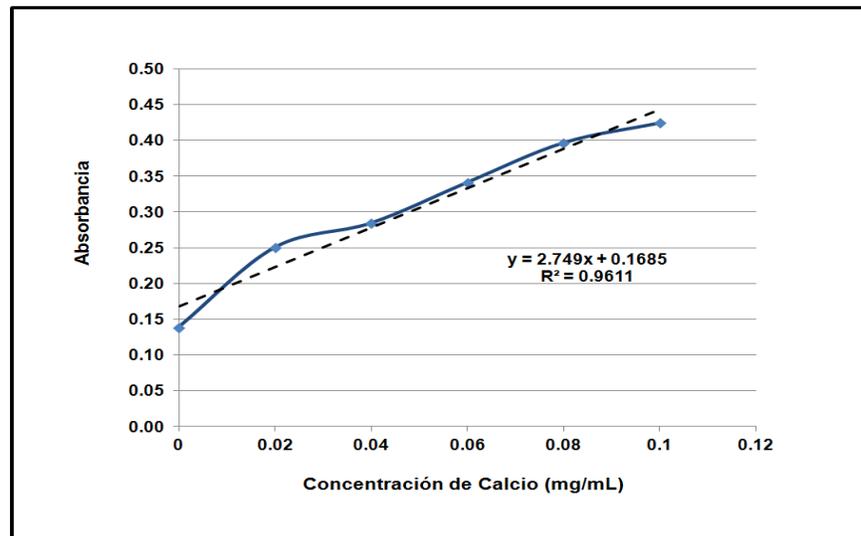


Figura. Curva patrón de calcio

## 10. Bibliografía

1. Adler, J., (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 27(6): 1256-1261
2. Adt, I. Dupas, C. Boutrou, R. Oulahal, N. Noel, C. Mollé, D. Jouvét, T y Degraeve, P. (2011). Identification of caseinophosphopeptides generated through in vitro gastrointestinal digestion of Beaufort cheese. *International Dairy Journal* 21: 129-134
3. Aimutis, W., (2004). Bioactive peptides of milk proteins with particular focus on anticarcinogenesis. *Journal of Nutrition* 134:989-995
4. Algaron, F., Miranda, G., Le Bars, D., y Monnet, V., (2004). Milk fermentation by *Lactococcus lactis* with modified proteolytic system to accumulate potentially bioactive peptides. *Lait* 84: 115-123
5. Ashar, M., y Chand, R., (2004). Fermented milk containing ACE-inhibitory peptides reduces blood pressure in middle aged hypertensive subjects. *Milchwissenschaft* 59:363-366
6. Bouglé, D., y Bouhallab, S., (2006). Mineral-Binding proteins and peptides and bioavailability of trace elements. *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease*. Ed. Taylor y Francis, pp. 29-40
7. Brown M., y Rydqvist, B., (1981). Arsenazo III-Ca<sup>2+</sup>. Effect of pH, ionic strength and arsenazo III concentration on equilibrium binding evaluated with Ca<sup>2+</sup> ion-sensitive electrodes and absorbance measurements. *Biophysical Journal* 36: 117-137
8. Chabance, B., Jolles, P., Izquierdo, C., Mazoyer, E., Francoual, C., Drouet, L., y Fiat, M., (1995). Characterization of an antithrombotic peptide from  $\kappa$ -casein in new born plasma alters milk ingestion. *British Journal of Nutrition* 73(4):583-590
9. Cheftel, J., Cuq, J., y Lorient, D., (1989). Proteínas alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas, Acribia, España, pp 179-205
10. Coolbear, T., Pillidge, C., y Crow, V., (1994). The diversity of potential cheese ripening characteristics of lactic acid starters and levels and cellular distribution of proteinase activities. *International Dairy Journal*. 4, 697-721
11. Corsetti, A., Massitti, O., Minervini, F., Fox, P., y Gobbetti, (2003). Production of caseinophosphopeptides from Na-caseinates prepared from the milk of several species by proteinase of *Lactobacillus helveticus* PR4. *Food Biotechnology* 17: 183-192
12. Courtney, P., (1999). *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and *cremoris*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Ed. Batt, C., y Patel, P., Academic Press. pp 1166-1171
13. Cross, K., Huq, L., Bicknell, W., y Reynolds, E., (2001). Cation- dependent structural features of beta-casein-(1-25). *Biochemical Journal* 356: 277-286
14. Cross, K., Huq, L., Palamara, J., Perich, J., y Reynolds, E., (2005). Physicochemical Characterization of Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate Nanocomplexes. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 15362-15369
15. Crow, V., Holland, R., Pritchard, G., y Coolbear, T., (1994). The diversity of potential cheese ripening characteristics of lactic acid starter bacteria: 2. The levels and subcellular distributions of peptidase and esterase activities. *International Dairy Journal* 4, 723-742
16. Cushman, D., y Cheung, H., (1971). Spectrophotometric assay and properties of angiotensin converting enzyme of rabbit lung, *Biochemical Pharmacology* 20: 1637-1648
17. Decker M., (2001). *Applied Dairy Microbiology*, 2<sup>nd</sup> Edition. Edited by Elemer H. Marth.

18. Dimitrov, Z., (2009). Characterization of bioactive peptides with calcium-binding activity released by specially designed cheese starter. *Biotechnology & Biotechnology EQ.* 927-930
19. Doeven, M., Kok, J., y Poolman, B., (2005). Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Molecular Microbiology* 57(3): 640-649
20. Duncan, A., Jager, A., y Van Staden, J., (1999). Screening of Zulu medicinal plants for angiotensin converting enzyme (ACE). *Journal of Ethnopharmacology* 68: 63-70
21. Exterkate, F., y Alting, A., (1993). The conversion of  $\alpha_{s1}$ -Casein-(1-23)-fragment by free and bound form of the cell-envelope proteinase of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* under conditions prevailing in cheese. *Systematic Applied Microbiology* 16: 1-8
22. Farvin, K., Baron, C., Nielsen, N., y Jacobsen, C., (2010). Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 1-in vitro assays and evaluation in  $\omega$ -3 enriched milk. *Food Chemistry* 123: 1081-1089
23. Fernández-Espla, M., Garault, P., y Monnet, V., (2000). *Streptococcus thermophilus* Cell Wall Proteinase: Release, Purification, and Biochemical and Genetic Characterization. *Applied and Environmental Microbiology* 66(11):4772-4778
24. Fiat, M., Lévy-Toledano, S., Caen, P., y Jollès, P., (1989). Biologically active peptides of casein and lactotransferrin implicated in platelet function. *Journal of Dairy Research* 56, 351-355
25. Fiat, M., Migliore-Samour, D., Jollès, P., Drouet, L., Bal dit Sollier, C., y Caen, J., (1993). Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *Journal of Dairy Science.* 76, 301-310
26. Figueroa, C., (2007). Utilización del sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* para la generación de péptidos potencialmente bioactivos [Tesis de maestría]. División de Ciencias Biológicas y de la Salud – UAM Iztapalapa. México D.F. 19 de diciembre de 2007
27. Fitzgerald, R., (1998). Potential uses of caseinophosphopeptides *International Dairy Journal* 8: 451-457
28. Fitzgerald R., Murray, B., y Walsh, D., (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *Journal of Nutrition*; 134: 980S-988S
29. Foltz, M., Cerstiaens, A., Van Meensel, A., Mols, R., Van Der Pijil, P., y Duchateau, G., (2008). The angiotensin converting enzyme inhibitory tri-peptides Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro show increasing permeabilities with increasing physiological relevance of absorption models. *Peptides.* 29:1312-1320
30. Fox, P., (2001). Milk proteins as food ingredients. *International Journal of Dairy Technology* 54: 41-55
31. Fuglsang, A., Rattray, F., Nilsson, D., y Nyborg, N., (2003). Lactic acid bacteria: Inhibition of angiotensin converting enzyme *in vitro* and *in vivo*. *Antonie van Leeuwenhoek* 83:27-34
32. Gill, S., Doull, F., Rutherford, J., y Cross, L., (2000). Immunoregulatory peptides in bovine milk. *British Journal of Nutrition* 58 111–117
33. Gobbetti, M., Ferranti, P., Smachi, E., Goffredi, F., y Addeo, F., (2000). Production of angiotensin-I-converting –enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiology* 66:3898-3904
34. Guo, Y., Pan, D., y Tanokura, M., (2009). Optimisation of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory-peptides from whey protein using response surface methodology, *Food Chemistry* 114:328-333

35. Hannon, J. A., Deustch, S., Madec, M., Gassi, J., Chapot-Chartier, M., y Lortal, S., (2006). Lysis of starters in UF cheeses: Behaviour of mesophilic lactococci and thermophilic lactobacilli. *International Dairy Journal*, 16, 324-334
36. Hartmann, R., y Meisel, H., (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology* 18: 163-169
37. Hayes, M., Ross, P., Fitzgerald, G., y Stanton, C., (2007). Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part I: Overview. *Biotechnology Journal* 2:426-434
38. Heaney, R. (2000). Calcium, dairy products and Osteoporosis. *Journal of the American College of Nutrition* 19, 83S-99S
39. Helinck, S., Richard, J., y Juillard, V., (1997). The effects of adding lactococcal proteinase on the growth rate of *Lactococcus lactis* in milk depend on the type of enzyme. *Applied and Environmental Microbiology* 63(6): 2124-2130
40. Hernández, Amigo, L., Ramos, M., y Recio, I., (2004). Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1504-1510
41. Hernández, B., Contreras, M., y Recio, I., (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in colloid and interface science* 165:23-35
42. Hintze, J. 2000. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA. [www.ncss.com](http://www.ncss.com).
43. Hugenholtz, J., y Smid, E., (2002). Nutraceutical production with food-grade microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 497-507
44. Hwang, J., Shue, Y., Chang, H., (2001). Antioxidative activity of roasted and defatted peanut kernels. *Food Research International* 34:639-647
45. Iwan, M., Jarmolowska, B., Bielkiewicz, K., Kostyra, E., Kostyra, H., y Kaczmarek, M., (2008). Transport of  $\mu$ -opioid receptor agonists and antagonist peptides across Caco-2 monolayer. *Peptides* 29: 1042-1047
46. Jiang, Z., Tiang, B., Brodkord, A., y Huo, G., (2010). Production, analysis and in vivo evaluation of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from bovine casein. *Food Chemistry* 123: 779-786
47. Jiménez, J., y García, M., (2006). Propiedades nutraceuticas de las proteínas del suero y sus fracciones. *Carnilac* 22-27
48. Juillard, V., Le Bars, D., y Kunji, E., (1995). Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Applied Environmental Microbiology* 61: 3024-3030
49. Kayser, H., y Meisel, H., (1996). Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from milk proteins. *FEBS Letters* 383: 18-20
50. Kim, S., y Lim, J., (2004). Calcium-binding peptides derived from tryptic hydrolysates of cheese whey protein. *Asian-australas. Journal of Animal Science* 17:1459-1464
51. Kitts, D. (2006). Calcium binding Peptides. *Nutraceutical proteins and peptides in health and disease*. Ed. Taylor y Francis, pp.11-27.
52. Kok, J., (1990). Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 87: 15-42
53. Kok, J., y De Vos, W., (1994). The proteolytic system of lactic acid bacteria in Gasson, M., De Vos, W., (eds) *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*. Blackie Academic & Professional, Glasgow, U.K., pp. 169-210

54. Konings, W., Poolman, B., y Driessen, A., (1989). Bioenergetics and solute transport in Lactococci. *Critical Reviews in Microbiology* 16 : 419-476
55. Korhonen, H., (2009). Milk- derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods* 1: 177-187
56. Korhonen, H., y Pihlanto, A. (2003a). Food-derived Bioactive Peptides – Opportunities for designing Future Foods. *Current Pharmaceutical Design* 9:1297-1308
57. Korhonen, H., y Pihlanto, A., (2003b). Bioactive peptides: new challenges and opportunities for the dairy industry. *Australian Journal of Dairy Technology* 58:129-134
58. Korhonen, H., y Pihlanto, A., (2003c). Bioactive peptides and proteins. *Advances in Food and Nutrition Research* 47: 175-276
59. Korhonen, H., y Pihlanto, A., (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal* 16: 945-960
60. Kunji, E., Mierau, I., Poolman, B., Konings, W., Venema, G., y Kok, J., (1996). The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70:187-227
61. Law, J., y Haandrikman, A., (1997). Proteolytic Enzymes of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 7: 1-11
62. LeBlanc, J. G., Matar, C., Valdéz, J., LeBlanc, J., y Perdigon, G., (2002). Immunomodulating effects of peptidic fractions issued form milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science* 85: 2733-2742
63. Liu, J. Chen, M. y Lin, C. (2005). Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soy milk- kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:.2467-2474
64. 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
65. Lorenzen, P., y Meisel, H., (2005). Influence of trypsin action in yoghurt milk on the release of caseinophosphopeptide-rich fractions and physical properties of the fermented products. *International Journal of Dairy Technology* 58: 119-124
66. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., y Randall, R., (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275
67. Maeno, M., y Takano, T., (1999). Purification and Characterization of an Antihypertensive Peptide from a Yogurt-Like Product Fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *Journal of Dairy Science* 82:1388-1393
68. Maeno, M., Yamamoto, N., y Takano, T., (1996). Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science* 79: 1316
69. Matar, C., Valdez, J., Medina, M., Rachid, M., y Perdigon, G., (2001). Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant. *Journal of Dairy Research* 68: 601-609
70. Mazoyer, E., Lévy-Toledano, S., Rendu, F., Hermant, L., Lu, H., Fiat, A. M., Jollès, P. y Caen, J., (1990). KRDS, a new peptide derived from human lactotransferrin, inhibits platelet aggregation and release reaction. *European Journal of Biochemistry* 194, 43-49
71. McIntosh, G., Regester, G., Le-Leu. R., Royle, P., y Smithers, G., (1995). Dairy proteins protect against dimethylhydrazine-induced intestinal tumors in rats. *Journal of Nutrition* 125: 809-816
72. Meisel, H., (1997). Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. *Livestock Production Science* 50: 125-138

73. Meisel, H., (1998). Overview on Milk Protein-derived Peptides. *International Dairy Science Journal* 8:363-373
74. Meisel, H., (2001). Bioactive peptides from milk proteins: a perspective for consumers and producers. *Australian Journal of Dairy Technology* 56: 83-92
75. Meisel, H., y Fitzgerald, R., (2000). Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *British Journal of Nutrition* 84: S27-S31
76. Meisel, H., y Fitzgerald, R., (2003). Biofunctional peptides from Milk Proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design* 9:1289-1295
77. Meisel, H., y Olieman, C., (1998). Estimation of calcium- binding constants of casein phosphopeptides by capillary zone electrophoresis. *Analytica Chimica Acta* 372: 291- 297
78. Meisel, H., Walsh, D., Murray, B., y Fitzgerald, R., (2006). ACE inhibitory-peptides in Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease. Ed. CRC Press. Pp 269-316.
79. Migliore-Samour, D., Floc'h, F., y Jollés, P., (1989). Biologically active peptides implicated in immunomodulation. *International Dairy Research* 56 : 357-362
80. Miles, A., y Misra, S., (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of hygiene* 38 (6): 732-49.
81. Mine, Y., y Shahidi, F., (2006). Nutraceutical proteins and peptides in health and disease. Ed. Taylor y Francis, pp 648-650
82. Mizuno, S., Nishimura, S., Matura, K., Gotou, T., y Yamamoto, N., (2004). Release of short and proline-rich antihypertensive peptides from casein hydrolysate with *Aspergillus oryzae* protease. *Journal of Dairy Science* 87: 3183-3188
83. Monnet, V., Chaptot-Chartier, M., y Gripon, J., (1993). Les peptidases des lactocoques, *Lait*, 73-97-108
84. Naito, H., Kawakami, A., y Inamura, T., (1972). In vivo formation of phosphopeptide with calcium- binding property in the small intestinal tract of the rat fed on casein. *Agricultural and Biological Chemistry* 36:409-415
85. Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamakazi, S., y Takano, T., (1995). Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science* 78:777-783
86. Niven, G., y Mulholland, F., (1998). Cell membrane integrity and lysis in *Lactococcus lactis*: the detection of population of permeable cells in post-logarithmic phase cultures. *Journal of Applied Microbiology* 84, 90-96.
87. Ong, L., y Shah, N., (2008). Release and identification of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. *Food Science and Technology* 9: 1555-1566,
88. Ondetti, M., Rubin, B., y Cushman, D., (1977). Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* 4288:441-444
89. Otte, J., Lenhard T., Flambard, B., y Sørensen, K., (2011). Influence of fermentation temperature and autolysis of ACE- inhibitory activity and peptide profiles of milk fermented by selected strains of *Lactobacillus helveticus* and *Lactococcus lactis*. *International Dairy Journal* 21:229-238
90. Pan, D., y Guo, Y., (2010) Optimization of sour milk fermentation for the production of ACE-inhibitory peptides and purification of a novel peptide from whey protein hydrolysate *International Dairy Journal* 20:472-479
91. Pariza, M., (1997). Conjugated linoleic acid; a newly recognized nutrient. *IFT Annual Meeting Orlando FL, Abstract* 15-3

92. Phelan, M., Aherne, A., Fitzgerald, R., y O'Brien, N., (2009). Casein- derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal* 19: 643-654
93. Pihlanto, A., (2001). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends in Food Science Technology*. 11: 347-356
94. Pihlanto, A., Rokka, T., y Korhonen, H., (1998). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International Dairy Journal* 8: 325-331
95. Pihlanto, A., Virtanen, T., y Korhonen, H., (2010). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *International Dairy Journal* 20: 3-10
96. Pripp, A., Isaksson, T., Stephaniak, L., y Sorhaug T., (2004). Quantitative structure-activity relationship modeling of ACE- inhibitory peptides derived from milk proteins. *European Food Research and Technology* 219:579-583.
97. Pritchard, G., y Coolbear, T., (1993). The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology reviews* 12: 179-206
98. Quirós, A., Dávalos, A., Lasunción, M., Ramos, M., y Recio, I., (2008). Bioavailability of the antihypertensive peptide LHLPLP: transepithelial flux of HLPLP. *International Dairy Journal*. 18:279-286
99. Rodríguez, J., Reyes, R., González, A., Troncoso, R., Vargas I., y Vallejo, B., (2010). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk fermented by wild and industrial *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Dairy Science* 93: 5032-5038.
100. Roufik, S., Gauthier, S, y Turgeon, S., (2006). In vitro digestibility of bioactive peptides derived from bovine beta-lactoglobulin. *International Dairy Journal* 16: 294-302
101. Savijoki, K., Ingmer, H., y Varmanen, P., (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 394-406
102. Schanbacher, F., Murray, F., Thorton, J., Morley, S., Lilleyman, J., Onwude, J., Currie, I., Crompton, A., y Talhouk, R., (1997). Biology and origin of bioactive peptides in milk. *Livestock Production Science*. 50(1): 105-123
103. Schlimme, E., y Meisel H., (1995). Bioactive peptides derived from milk proteins: structural, physiological and analytical aspects. *Die Nahrung* 39: 1-20
104. Séverin, S., y Wenshui, X., (2005). Milk Biologically active components as nutraceuticals: review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45: 645-656
105. Shah, N., (2000). Effects of milk- derived bioactives: an overview. *British Journal of Nutrition* Suppl.1 S3-S10
106. Shimizu, M. (2004). Food-derived peptides and intestinal functions. *Biofactors* 21:43
107. Silva, S., y Malcata X., (2005). Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal* 15:1-15
108. Smacchi, E., y Gobetti, M., (2000). Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology* 17: 129-141
109. Smid, E., Poolman, B., y Konings, W., (1991). Casein utilization by Lactococci. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2447-2452
110. Sütas, Y., Hurme, M., y Isolauri, E., (1996). Down-regulation of anti-CD3 antibody-induced IL-4 production by bovine caseins hydrolysed with Lactobacillus GG-derived enzymes. *Scandinavian Journal of Immunology* 43: 687-689
111. Tan, P., Poolman, B., y Konings, W., (1993). Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Research* 60: 269-285
112. Teuber, M., y Geis, A., (2006). The genus *Lactococcus*. *Prokaryotes* 4:205-228

113. Tong, M., Sasaki, S., Julian, D., y Decker, A., (2000). Mechanisms of antioxidant activity of high molecular weight fraction of whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:1473-1478
114. Torres, M., Vallejo, B., y González, B., (2005). Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 55(2):111-117
115. Van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., Van Hylckama Vlieg, J., Smit, B., Ayad, E., Smit, G., y Siezen, R., (2002). Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal* 12: 111-121
116. Vegarud, G., Langsrud, T., y Svenning, C., (2000). Mineral-binding milk proteins and peptides; occurrence, biochemical and technological characteristics. *British journal of Nutrition* 84: S91-S98
117. Visser, S., Exterkate, F., Slangen, C., y De Veer G., (1986). Comparative study of action of cell wall proteinases from various strains of *Streptococcus cremoris* on bovine  $\alpha_{s1}$ -,  $\beta$ -, and  $\kappa$ - casein. *Applied Microbiology and Biotechnology* 29: 61-66
118. Walzem, R., Dillard, C., y German, J., (2002). Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: What we know and what we may overlooking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42(4): 353-373
119. Wong, C., y Watson, D., (1995). Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice. *Journal of Dairy Research* 62: 359-368
120. Yamamoto, M., Akino, A., y Takano, T., (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science* 77: 917
121. Yamamoto, N., y Takano, T., (1999). Antihypertensive peptides derived from milk proteins. *Nahrung* 43: 159-164
122. Zidane, F., Matéos, A., Cakir-Kiefer, C., Miclo, L., y Corbier, C., (2011). Binding of divalent metals ions to 1-25  $\beta$ -caseinophosphopeptide: an isothermical titration calorimetry study. *Food Chemistry* 132: 391-398