



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE BACTERIAS
UTILIZADAS COMO PROBIÓTICOS PRESENTES EN LECHE
FERMENTADAS COMERCIALES**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGÍA
P R E S E N T A
ING. ITZAMNÁ BAQUEIRO PEÑA**

DIRECTORA DE TESIS: M. EN C. LORENA DEL CARMEN GÓMEZ RUÍZ

SINODAL: DR. JOSÉ LUIS PARADA LÓPEZ

MÉXICO, D. F.

MAYO 2004.



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE
BACTERIAS UTILIZADAS COMO PROBIÓTICOS PRESENTES
EN LECHE FERMENTADAS COMERCIALES**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGÍA
P R E S E N T A
ING. ITZAMNÁ BAQUEIRO PEÑA**

**DIRECTORA DE TESIS: M. EN C. LORENA DEL CARMEN GÓMEZ RUÍZ
SINODAL: DR. JOSÉ LUIS PARADA LÓPEZ**

MÉXICO, D. F.

MAYO 2004.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la Tesis: Determinación de la actividad proteolítica de bacterias utilizadas como probióticos presentes en leches fermentadas comerciales, que presentó la alumna de la Especialidad en Biotecnología Itzamná Baqueiro Peña

Directora de Tesis:

M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruíz
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

Jurado:

Dr. José Luis Parada López
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

A Sarah,

El sol de todos mis días.

AGRADECIMIENTOS:

A la Universidad Autónoma Metropolitana, por darme la oportunidad de seguir haciendo camino.

A mis asesores y amigos: M. en C. Lorena Gómez Ruiz, Dr. José Luis Parada, Dr. Mariano García Garibay y M. en C. Alma E. Cruz Guerrero.

Por el apoyo, ayuda y motivación a la Dra. Gabriela Rodríguez Serrano y Dra. Judith Jiménez Guzmán.

A mis padres, hermanas y tía Eva, por la comprensión, paciencia y apoyo.

A los grandes chiquititos que día a día me enseñan tanto: Lichis, Lolita, Pepino, Job y Balam

A mis amigas Alexa, Lorena y Areli.

A Angélica Flores, Luis Guillermo González, Christian Sarabia, Héctor Oropeza, y Paola Ortiz Chao por su amistad y compañía.

A Omar Victoria, por las palabras y la música en los días de silencio.

A ti Alex, por recordarme que el camino sigue y sigue.

Y a todos los que hicieron posible la realización de este proyecto.

INDICE

Contenido	Página
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Objetivo	3
4. Revisión bibliográfica	4
4.1 Probióticos	4
4.1.1 Tracto digestivo	6
4.1.2 Sistema inmunológico	7
4.1.3 Sistema cardiovascular	7
4.1.4 Tracto urogenital	7
4.2 Bacterias ácido lácticas	7
4.3 Sistema proteolítico de bacterias ácido lácticas	8
4.3.1 Proteasas	8
4.3.2 Peptidasas	9
4.3.2.1 Endopeptidasas	9
4.3.2.2 Dipeptidasas y tripeptidasas	10
4.3.2.3 Aminopeptidasas	10
4.3.2.4 Transporte de Aminoácidos y péptidos	11
4.4 Proteínas de la leche	11
4.5 Péptidos Bioactivos	12
4.6 Clasificación de los péptidos bioactivos	12
4.6.1 Péptidos opioides	12
4.6.2 Péptidos inmunoestimuladores	13
4.6.3 Péptidos acarreadores de minerales	15
4.6.4 Péptidos antitrombóticos	15
4.6.5 Péptidos bactericidas	16
4.6.6 Péptidos antihipertensivos	16
4.7 Péptidos bioactivos en leches fermentadas	17
4.8 Uso de péptidos bioactivos en alimentos funcionales y farmaceuticos	17

Contenido	Página
5. Materiales y procedimientos	19
5.1 Morfología de Microorganismos presentes en leches fermentadas comerciales	20
5.2 Actividad proteolítica	20
5.3 Determinación de la actividad proteolítica en leches fermentadas comerciales	21
5.4 Cuenta viable de cultivos lácteos	21
5.5 Cinéticas para la determinación de péptidos solubles	22
5.5.1 Preparación de la leche	23
5.5.2 Adición del inóculo	23
5.5.3 Determinación de péptidos solubles producidos durante la fermentación	23
6. Resultados y Discusión	25
6.1 Microorganismos presentes en leches fermentadas Comerciales	25
6.2 Determinación de actividad proteolítica de leches fermentadas comerciales	28
6.3 Determinación de actividad proteolítica de leches fermentadas comerciales en placa de agar- caseína	31
6.4 Cuenta viable de cultivos lácteos	32
6.5 Cinéticas para la determinación de péptidos solubles	32
7. Conclusiones	40
8. Bibliografía	42

INDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
Figura 1. Metabolismo de proteínas	9
Figura 2. Microorganismos presentes en Actimel	25
Figura 3. Microorganismos presentes en Chamyto	25
Figura 4. Microorganismos presentes en LC1	26
Figura 5. Microorganismos presentes en Soful	26
Figura 6. Microorganismos presentes en Yakult	27
Figura 7. Microorganismos presentes en Yogurt natural Danone	27
Figura 8. Determinación de actividad proteolítica de leches fermentadas comerciales en placa de agar-caseína	31
Figura 9. Evaluación de los péptidos solubles producidos durante la fermentación de leche descremada (12%S.T.) inoculada con Actimel (1×10^9 UFC/100 ml) a 40°C	33
Figura 10. Evaluación de los péptidos solubles producidos durante la fermentación de leche descremada (12%S.T.) inoculada con LC1 (1×10^9 UFC/100 ml) a 40°C	34
Figura 11. Evaluación de los péptidos solubles producidos durante la fermentación de leche descremada (12%S.T.) inoculada con Soful (1×10^9 UFC/100 ml) a 40°C	35
Figura 12. Evaluación de los péptidos solubles producidos durante la fermentación de leche descremada (12%S.T.) inoculada con Yakult (1×10^9 UFC/100 ml) a 40°C	36
Figura 13. Evaluación de los péptidos solubles producidos durante la fermentación de leche descremada (12%S.T.) inoculada con Yogurt natural Danone (1×10^9 UFC/100 ml) a 40°C	37

INDICE DE TABLAS

Contenido	Página
Tabla 1. Compuestos antimicrobianos producidos por bacterias ácido lácticas en leches fermentadas	5
Tabla 2. Peptidasas de bacterias ácido lácticas	11
Tabla 3. Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de leche	13
Tabla 4. Principales funciones de los péptidos de origen lácteo y ejemplos	14
Tabla 5. Temperaturas de incubación	22
Tabla 6. Actividad proteolítica de leches fermentadas comerciales	28
Tabla 7. Cuenta viable de Leches fermentadas	32

RESUMEN

Este estudio fue realizado para conocer el potencial de producción de péptidos bioactivos durante la elaboración de seis leches fermentadas (Actimel, Chamyto, LC1, Yogurt natural Danone, Soful y Yakult).

En la primera etapa se realizaron fijaciones por la técnica de Gram para evidenciar la presencia de microorganismos de cada producto

Por la técnica de Kunitz (1947), se determinó la actividad proteolítica de los diferentes leches fermentadas comerciales y se encontró que Yogurt natural Danone, LC1, Soful, Actimel, fueron los productos que presentaron mayor actividad y en su formulación presentan microorganismos del yogurt.

Se determinó la actividad proteolítica en placa de agar – caseína (Molin y Ternström, 1982), utilizando como inóculo los productos fermentados comerciales, esta técnica nos permitió respaldar la información obtenida de la técnica de Kunitz, encontrando por ambas técnicas que los productos comerciales con mayor actividad proteolítica fueron: Yogurt natural Danone y LC1

Posteriormente, se realizó la cuenta viable de cada producto comercial con el fin de inocular el mismo número de microorganismos en cada fermentación.

En una segunda etapa, se inoculó 1×10^9 ufc/100 ml en leche descremada al 12% (S.T.), se llevaron a cabo fermentaciones. Se determinaron péptidos solubles con el método de Lowry *et al* (1951), a las muestras obtenidas durante la fermentación tratadas previamente con TCA para eliminar proteína.

La generación de péptidos solubles en los productos es variable, ya que se puede observar generación, consumo y acumulación de péptidos solubles en las fermentaciones.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que los productos comerciales fermentados que se probaron, poseen microorganismos con diferente actividad proteolítica. Entre ellos Yogurt natural de Danone, LC1, Soful y Actimel resultaron los más interesantes por la cantidad de péptidos que se presentaron a lo largo de la fermentación. Para saber si algunos de estos péptidos son bioactivos, será necesario realizar una purificación y caracterización de los mismos.

2. INTRODUCCIÓN

En la década pasada se demostró que las proteínas no deben ser consideradas solo como componentes nutricionales, ya que también poseen otras propiedades biológicas.

En particular dentro de la estructura primaria de las proteínas de la leche, se han observado algunas secuencias de aminoácidos que corresponden a la de péptidos que presentan ciertas actividades biológicas como son: regulación del sistema inmune, regulación de la presión sanguínea, transporte de minerales, antitrombóticos, bactericidas, antigástricos, etc, por lo que se les denomina péptidos bioactivos. Estos péptidos, por formar parte de las proteínas de la leche se dice que están encriptados y son liberados a través de procesos enzimáticos, ya sea durante la digestión de las proteínas en el tracto gastrointestinal, o por las enzimas de las bacterias lácticas que intervienen en la elaboración de productos lácteos fermentados como quesos y leches fermentadas.

Las leches fermentadas además de su amplia aceptación como alimentos nutritivos, han sido utilizadas como el principal vehículo para el consumo de bacterias con características probióticas, por los humanos en el transcurso de las últimas dos décadas, particularmente las bacterias que tienen la capacidad de implantarse en la flora intestinal como algunas especies de bifidobacterias, *Lactobacillus casei* o *Lactobacillus acidophilus* (García- Garibay, 2003)

Dado que estas bacterias probióticas son capaces de sintetizar proteasas que hidrolizan las proteínas de la leche y de liberar una gran variedad de péptidos en el medio y que puedan ser las responsables de los efectos benéficos a la salud atribuidas a las bacterias (Leclerc *et al*, 2002).

Los péptidos formados dependen del sitio de proteólisis, de la proteína precursora y de la acción sinérgica de los péptidos con los compuestos no peptídicos (lípidos, glicolípidos y oligosacáridos) (Smacchi y Gobbetti, 2000).

En este trabajo se pretende estudiar la actividad proteolítica de seis leches fermentadas comerciales (Actimel, Chamyto, LC1, Soful, Yakult y Yogurt natural Danone); y conocer la capacidad de generar péptidos bioactivos durante su elaboración.

3. OBJETIVO

Estudiar la actividad proteolítica de diferentes cultivos probióticos para conocer su potencial de producción de péptidos bioactivos durante la elaboración de leches fermentadas.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. PROBIÓTICOS

Los probióticos son microorganismos vivos incorporados como suplementos a algunos alimentos para beneficiar la salud del huésped humano o animal a través del mejoramiento del balance de su flora intestinal (García- Garibay, 1993; Shah, 2000; Kalantzopoulos, 1997; Schaafsma, 2002).

En años recientes se ha incrementado el interés en la salud a través de la prevención de enfermedades por la incorporación de bacterias probióticas a los alimentos para contrarrestar el efecto de las bacterias dañinas en el tracto intestinal. (Torrez, 1997) El conocimiento de los efectos benéficos de algunas de las bacterias de la flora intestinal se inicia a principios de siglo con los trabajos de Metchnikoff. Desde entonces, se ha desarrollado un creciente interés por las bacterias con características probióticas en los humanos, tanto en el sector científico como en el industrial, particularmente en gran parte de los países europeos, en Japón, en EUA y Canadá.

Los productos lácteos fermentados son considerados vehículos a través de los cuales, el consumidor recibe el número adecuado de bacterias probióticas. Las cuentas deberán ser mayores a 1×10^7 ufc g^{-1} para asegurar el efecto probiótico (Vinderola y Reinheimer, 2000)

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

En la tabla 1 se muestran los compuestos antimicrobianos producidos por bacterias lácticas

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

Tabla 1. Compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias ácido lácticas utilizadas en leches fermentadas (García- Garibay, 1993).

BACTERIA FABRICANTE	COMPUESTO	MICROORGANISMOS SENSIBLES
Bacterias lácticas en general	Ácido láctico y otros ácidos	Bacterias en general
Bacterias lácticas en general	Peróxido de hidrógeno (activa el sistema lactoperoxidasa)	Bacterias gramnegativas y fungi (bactericida) Bacteriostático de bacterias grampositivas
Bacterias lácticas en general	Diacetilo	Bacterias y levaduras
<i>L. lactis</i> ssp. <i>Lactis</i>	Niacina (biocida de naturaleza peptídica)	Bacterias grampositivas
<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> :	Diplocina (biocida de naturaleza peptídica)	Bacterias grampositivas
<i>L. delbrueckii</i> ss. <i>bulgaricus</i> :	Bulgaricano (biocida de naturaleza peptídica)	Bacterias gramnegativas y positivas
<i>L. acidophilus</i> :	Lactobacilina (biocida de naturaleza peptídica)	Bacterias gramnegativas y positivas
<i>L. acidophilus</i>	Latocidina (biocida de naturaleza peptídica)	Bacterias gramnegativas y positivas
<i>L. acidophilus</i>	Acidolina (biocida de naturaleza peptídica)	Bacterias gramnegativas y positivas
<i>L. acidophilus</i>	Acidofilina (biocida de naturaleza peptídica)	Bacterias gramnegativas y positivas
<i>B. bifidum</i>	Biocidas no peptídicos	Bacterias
<i>P. freudenreichi</i> ss <i>shermani</i> :	Microgard (biocida no peptídico)	Bacterias gramnegativas y algunos fungi
<i>L. reuterii</i>	Reuterina (biocida no peptídico)	Bacterias y fungi

Las bacterias probióticas típicas de mayor aplicación y las que más interés han despertado en investigaciones alimenticias son algunas especies de bifidobacterias, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* (Gilliland 1998; Salminen *et al.* 1998).

Hoy en día se ha incrementado el interés por utilizar cepas diferentes a las tradicionales bacterias ácido lácticas. Dentro de las tradicionales bacterias ácido lácticas se encuentran: *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. casei* ssp *rhamnosus*, *L. delbrueckii* ssp *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *Saccharomyces boulardii*, *Lactococcus lactis* ssp *lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Strep. salivarius* ssp *thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*.

Los beneficios derivados del consumo de alimentos que contiene probióticos son ampliamente conocidos, por lo que actualmente se conocen más de 90 productos lácteos fermentados con probióticos alrededor del mundo. Los probióticos pueden ejercer beneficios principalmente en: el tracto digestivo, en el sistema inmunológico,

en el sistema cardiovascular y en el tracto urogenital (Schaafsma, 2002; Kalantzopoulos, 1997; Aso *et al* , 1998; Baricault *et al*, 1995; Crawford *et al*. 1980; Bensusan, 2002; Guarner, 2002).

4.1.1. TRACTO DIGESTIVO

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

Algunos probióticos muestran propiedades antiinflamatorias cuando actúan en la mucosa del intestino humano, se ha observado que la colonización con cepas de *Lactobacillus reuteri* pueden prevenir el desarrollo de colitis en ratones genéticamente susceptibles (Guarner 2002).

Estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo regular de productos lácteos puede reducir el cáncer de colon y cáncer de mama en humanos. El caso reciente de un estudio controlado, en el cual se suministraba un yogurt por día, fue asociado con la disminución del riesgo de adenomas en el colon (Rowland, 2002).

Van Niel *et al* (2002), realizaron un estudio acerca de la terapia con *Lactobacillus GG*, demostrando que estos son muy efectivos en casos de diarrea aguda y reducen la frecuencia de evacuaciones diarreicas y el tiempo de duración de la diarrea.

Una nueva opción de uso de probióticos en diarrea es la suplementación de soluciones de rehidratación oral con *Lactobacillus GG*, que ha mostrado ser inocuo y que resulta en una reducción del tiempo de duración de la diarrea (Guandalini *et al*, 2000).

4.1.2. SISTEMA INMUNOLÓGICO

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

En niños, se han sugerido probióticos para aminorar alergias a las proteínas de la leche por los efectos inmunomoduladores que estos ejercen, ya que el cambio de la

microflora intestinal de los niños, puede evitar el crecimiento de bacterias asociadas al desarrollo de diferentes tipos de dermatitis, entre ellas la dermatitis atópica.

El consumo diario de probióticos se puede lograr por medio de alimentos naturales, como es el yogur, de leches fermentadas adicionadas de lactobacilos y leches infantiles industrializadas adicionadas de probióticos (Mastretta *et al*, 2002; Pfeifer y Rosat, 1999).

En un estudio realizado en el centro de investigaciones de Yakult en Japón, se observó que la administración de *L casei Shirota* activa el sistema inmunológico en ratones. (Bensusan N, 2002).

Gill *et al* (2001), sugieren que el consumo de *Bifidobacterium lactis* HNO19, puede ser un efectivo suplemento para incrementar la inmunidad celular en la vejez, ya que ellos observaron un aumento de los fagocitos mono y polimorfonucleares.

4.1.3. SISTEMA CARDIOVASCULAR

Se ha demostrado que los péptidos inhibidores de enzima convertidora de angiotensina (ACE), formados en la leche durante la fermentación por ciertas bacterias lácticas, son capaces de disminuir la presión sanguínea (Schaafsma, 2002).

Kalantzopoulos (1997), reporta que algunas cepas de *L. acidophilus* pueden asimilar el colesterol malo en el intestino y reducir su absorción.

4.1.4. TRACTO UROGENITAL.

Los probióticos ayudan a reducir las infecciones en el tracto urogenital, así como la incidencia del cáncer de vejiga (Schaafsma, 2002).

Dentro de las nuevas líneas de investigación se ha incrementado el interés por el potencial de las bacterias probióticas para prevenir infecciones en tracto urinario (ITU). Esta inquietud se debe principalmente a la gran resistencia que han desarrollado las bacterias infecciosas a los antibióticos y a la reconocida actividad de los probióticos. Tres cepas de *Lactobacillus* mostraron capacidad para colonizar la vagina y actuar como barrera de uropatógenos. Su habilidad para producir crecimiento y adhesión antagonista contra patógenos urogenitales es clínicamente importante como un nuevo sistema de prevención de infecciones tracto urinarias (Reid, 2000).

4.2 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas se caracterizan por ser gram positivas, no esporuladas, fermentadoras de carbohidratos, fabricantes de ácido láctico, ácido tolerantes, proliferan en habitats anaerobios, catalasa negativa, no móviles, y no reductoras de

nitratos. Utilizan lactosa como fuente de carbono, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos, usan caseína como fuente de nitrógeno. (Bergey's manual). Estas bacterias se caracterizan por tener grandes requerimientos de factores de crecimiento como péptidos y aminoácidos, no pueden asimilar el nitrógeno inorgánico, pero son capaces de degradar proteínas y péptidos para satisfacer sus necesidades de crecimiento (Shihata y Shah, 2000; Beshkova *et al*, 1998; Meisel y *Bockelmann*, 1999; Chavagnat *et al*, 2000).

4.3 SISTEMA PROTEOLÍTICO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas tienen un sistema eficiente para reducir grandes subunidades de caseínas a oligopéptidos o pequeñas cadenas de aminoácidos y proveer a las células con los aminoácidos necesarios para su crecimiento en leche.

Aunque las bacterias ácido lácticas varían considerablemente en su capacidad para degradar las proteínas de la leche, muchos organismos poseen sistemas similares. Para las bacterias ácido lácticas, la caseína es la principal fuente de nitrógeno.

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

- * El primero consiste en la proteólisis de la caseína por proteasas ligadas a la pared celular para formar una gran cantidad de péptidos.
- * En el segundo paso, los péptidos son transportados dentro de las células por uno de los sistemas de transporte de péptidos.
- * Una vez dentro de la célula, los péptidos son degradados por un diverso grupo de peptidasas hasta formar aminoácidos libres, los cuales son metabolizados o asimilados en proteínas (Decker, 2001; Kranenburg *et al*, 2002; Juillard *et al*, 1995).

En la figura 1 se muestra el diagrama del metabolismo de proteínas

4.3.1 PROTEASAS

Las proteasas de las bacterias ácido lácticas realizan el primer paso en la degradación de la caseína. Las proteasas han sido clasificadas de acuerdo a su actividad y propiedades, de la siguiente manera:

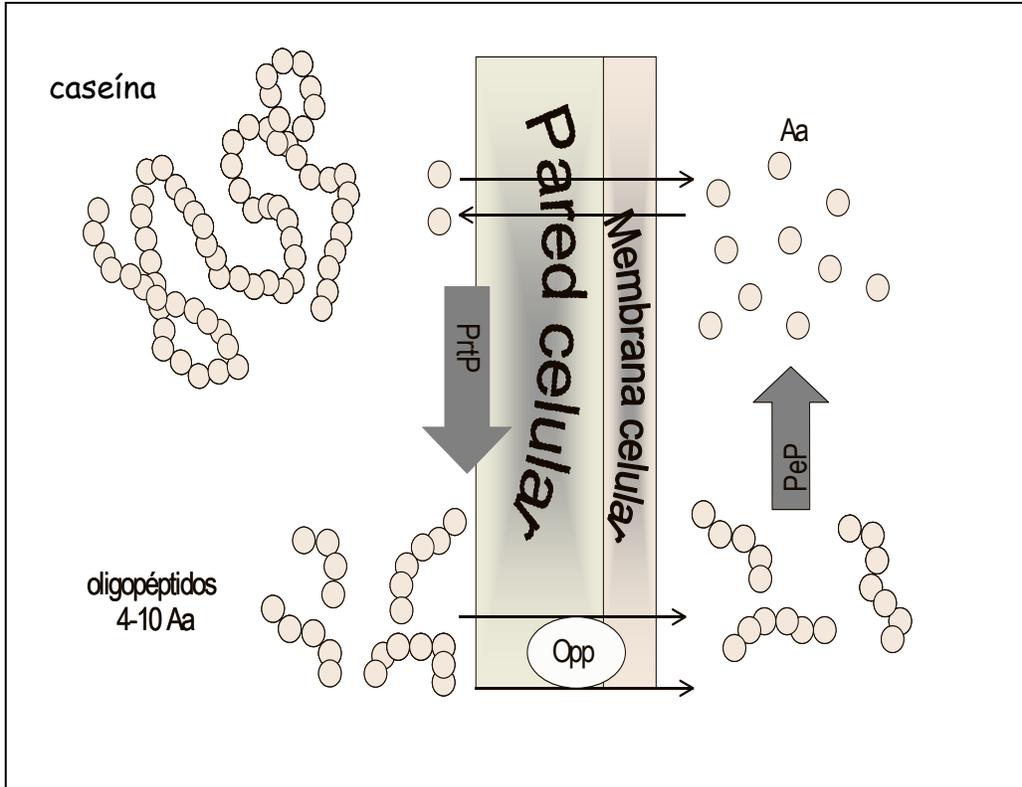
- Tipo P_I, que actúa sobre la β - caseína
- Tipo P_{III}, que actúa sobre la α_{s1} , κ - y β - caseína.
- Tipo P_I / P_{III}, que es una mezcla de las anteriores

Estas proteasas son específicas, por lo que han sido utilizadas para la formación de sabores en la elaboración de productos lácteos fermentados,

Estas proteasas que se encuentran ligadas a la pared celular (Prep.), degradan la caseína de la leche para formar oligopéptidos, los cuales son transportados a través

de las membranas por el sistema de transporte de oligopéptidos (Opp) (Tjwantan *et al*, 1993; Juillard *et al*, 1995;)

Figura 1. Metabolismo de proteínas



4.3.2 PEPTIDASAS

Los péptidos generados de la caseína por las proteasas, posteriormente son degradados por una gran variedad de peptidasas (PepA, PepE, PepF, PepO, PepX), degradando en pequeños péptidos y aminoácidos. Se ha encontrado que las peptidasas se encuentran dentro de la célula y son altamente específicas (Tjwantan *et al*, 1993). En la tabla 2, se mencionan las principales peptidasas de bacterias ácido lácticas

4.3.2.1 ENDOPEPTIDASAS

Muchas de éstas son metaloenzimas que contienen secuencias típicas con uniones Zn. Algunas de éstas (PepF) tienen pH óptimos en rango alcalino 7.5 – 9 (Decker, 2001).

4.3.2.2 DIPEPTIDASAS Y TRIPEPTIDASAS

Estas enzimas varían con respecto a sus propiedades bioquímicas y físicas. Muchas dipeptidasas son también prolinasas o prólidadas e hidrolizan los péptidos con N – C – terminal con residuos de prolina. (Decker, 2001).

Son necesarias para liberar la mayor cantidad de aminoácidos. Los productos liberados por la acción de endopeptidasas y aminopeptidasas son aminoácidos y pequeños péptidos (dipéptidos y tripéptidos). Para un eficiente proceso proteolítico, se requieren de numerosas peptidasas y tripeptidasas para liberar la mayor cantidad de aminoácidos. (Tjwantan *et al*, 1993; Kok y de Vos, 1994).

4.3.2.3 AMINOPEPTIDASAS

Las amino peptidasas son enzimas que hidrolizan péptidos N- terminal para generar aminoácidos N- terminal, son ampliamente encontradas en bacterias ácido lácticas. Las aminopeptidasas hidrolizan los péptidos en un rango de 2-12 aminoácidos y en general presentan baja actividad en dipéptidos con prolina. (Decker, 2001)

Entre la aminopeptidasas encontradas de bacterias ácido lácticas se encuentran la Glutamilaminopeptidasa y la X- prolildipeptidilaminopeptidasa

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

4.3.2.4 TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS Y PÉPTIDOS.

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

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

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

El transporte de di- y tripeptidos se lleva a cabo por el sistema derivado de la fuerza motivada por protones, el cual tiene alta especificidad de sustrato. Se ha observado

que el sistema de transporte de dipeptidos y tripéptidos tienen una afinidad considerable por dipéptidos que contienen prolina (Tjwantan *et al*, 1993)

Se ha sugerido que la principal función de estos transportadores es permitir simplemente excretar el exceso de aminoácidos del citoplasma para mantener una adecuada proporción (Decker, 2001)

Tabla 2. Peptidasas de bacterias ácido lácticas (Decker, 2001)

PEPTIDASA	ABREVIACIÓN	SUSTRATO O ESPECIFICIDAD
Aminopeptidasa A	Pep A	Glu/ Asp \downarrow (X) _n
Aminopeptidasa C	Pep C	X \downarrow (X) _n
Aminopeptidasa L	Pep L	Leu \downarrow X. Leu \downarrow X ₂
Aminopeptidasa N	Pep N	X \downarrow (X) _n
Aminopeptidasa P	Pep P	X \downarrow Pro \downarrow (X) _n
Aminopeptidasa X	Pep X	X \downarrow Pro \downarrow (X) _n
Pirrolidón Carboxil peptidasa	Pep	Glu \downarrow (X) _n
Dipeptidasa V	PepV	X \downarrow X
Dipeptidasa D	PepD	X \downarrow X
Tripeptidasa T	PepT	X \downarrow X ₂ X
Proiminopeptidasa	PepI	Pro \downarrow X \downarrow (X) _n
Prolidasa	PepQ	X \downarrow Pro
Prolinasa	PepR	Pro \downarrow X
Endopeptidasa F	PepF	(X) _n \downarrow X ₂ X \downarrow X \downarrow (X)
Endopeptidasa O	PepO	(X) _n \downarrow X \downarrow X \downarrow (X) _n
Endopeptidasa E	PepE	(X) _n \downarrow X \downarrow X \downarrow (X) _n
Endopeptidasa G	PepG	(X) _n \downarrow X \downarrow X \downarrow (X) _n

4.4 PROTEÍNAS DE LA LECHE

La leche es considerada como componente básico de la alimentación, ésta es rica en variedad de nutrientes esenciales, se considera que dentro de estos nutrientes, las proteínas juegan un papel importante. Las proteínas de la leche son divididas en caseínas y proteínas del suero. Las caseínas están constituidas por cuatro familias de moléculas (α_{s1} , α_{s2} , κ y β) que muestran polimorfismo genético con fosforilación y glicosilación.

Las proteínas del suero más abundantes son β - lactoglobulina y α - lactoalbúmina, de las cuales también se conocen variantes genéticas. La fracción de suero también contiene cantidades considerables de inmunoglobulinas y seroalbúminas las cuales

pasan a la glándula mamaria y son secretadas en la leche. La lactoferrina y la lactoperoxidasa son las proteínas mejor caracterizadas de la creciente lista de componentes protéicos menores del suero (Steijns, 2001).

Es importante mencionar que la proteólisis por bacterias ácido lácticas en leche, leches fermentadas y quesos contribuye a la generación de péptidos bioactivos (Smacchi y Gobetti, 2000).

4.5 PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Se conocen como péptidos bioactivos los fragmentos de proteínas que presentan actividades biológicas ya sea como opioides, acarreadores de minerales, inmunoestimuladores, antitrombóticos, antigástricos, etc.

Los péptidos bioactivos pueden ser liberados durante la elaboración de productos lácteos fermentados, ya que las proteasas presentes en los microorganismos fermentadores, hidrolizan las proteínas durante la fermentación y el almacenamiento. Los cultivos de bacterias contienen una gran diversidad de enzimas proteolíticas que son responsables del rompimiento de las proteínas en péptidos y aminoácidos. Durante la fermentación de la leche, muchos oligopéptidos son liberados por la degradación de las caseínas, los cuales pueden ser precursores de péptidos con actividades biológicas, cuando son fraccionados por otras enzimas. La baja especificidad de las peptidasas sugiere que todas las cadenas de péptidos pueden ser fraccionados parcialmente (Ryhänen *et al*, 2001).

Las proteínas de la leche son actualmente la principal fuente de péptidos bioactivos (tabla 3), éstos pueden ser obtenidos *in vitro* o *in vivo*. Los péptidos bioactivos derivados de proteínas se encuentran inactivos dentro de la secuencia de la proteína, hasta que son liberados por proteólisis enzimática (Meisel y Bockelmann, 1999).

Las funciones de los péptidos bioactivos se enlistan en la tabla 4.

4.6 CLASIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS

4.6.1 PÉPTIDOS OPIOIDES

Los receptores opioides (tipo μ , δ y κ) se encuentran localizados en el sistema nervioso, inmune, endócrino y en el tracto gastrointestinal de los mamíferos, estos receptores pueden interactuar con ligandos exógenos de opioides y opioides antagonistas.

Tabla 3. Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche (Meisel y Bockelmann, 1999).

PÉPTIDO BIOACTIVO	PROTEÍNA PRECURSORA	BIOACTIVIDAD
Casomorfina	α -, β - caseína	Opioide agonista
α - lactorfina	α - lactoalbúmina	Opioide agonista
β - Lactorfina	β - Lactoglobulina	Opioide agonista
Lactoferroxinas	Lactoferrina	Opioide antagonista
Casoxinas	κ - Caseína	Opioide antagonista
Lactoquininas	α - lactoalbúmina, β - lactoglobulina, seroalbúmina	Inhibidor de ACE
Inmunopéptidos	α -, β - caseína	Inmunoregulador
Lactoferricina	Lactoferrina	Antimicrobiano
Casocidina	α_{s2} - caseína	Antimicrobiano
Isracidina	α_{s1} - caseína	Antimicrobiano
Casoplatelina	κ - Caseína	Antitrombótico
Fosfopéptidos	α -, β - caseína	Acarreador de minerales

Los péptidos opioides son generados de la hidrólisis de las proteínas de la leche. Las exorfinas son péptidos derivados de la α -caseína, tienen propiedades farmacológicas similares al opio. Las α - y β -casomorfina (derivadas de la α y β -caseína), y las lactorfina (derivadas de la α y β - lactoalbúmina), actúan como opioides agonistas, mientras que las Casoxinas (derivadas de la κ - caseína), se comportan como opioides antagonistas. Las casomorfina (derivadas de la α y β -caseína), pueden producir analgesia, modulan la conducta social e influyen en la estimulación de la secreción de insulina y somatostatina, también pueden influir en la absorción gastrointestinal de los nutrientes, prolongar el tiempo de tránsito y ejercer una actividad antidiarréica (Meisel *et al*, 1997).

4.6.2 PÉPTIDOS INMUNOESTIMULADORES

Recientes investigaciones han demostrado que la actividad metabólica de bacterias ácido lácticas en leche, generan péptidos inmunoestimuladores a través de la vía enzimática, estos péptidos producen una respuesta mayor del sistema inmune a través de un aumento de la actividad fagocítica de los macrófagos humanos en contra de las viejas células rojas de la sangre.

Tabla 4. Principales funciones de los péptidos de origen lácteo y ejemplos (Schanbacher *et al*, 1997)

EFFECTOS	EFFECTOR
 Digestión y función gastrointestinal	
Aumenta la velocidad del movimiento peristáltico	Péptido opioide agonista (casomorfina, lactoferrina)
Disminuye la motilidad intestinal	Opioide antagonista (Casoxinas, Lactoferrinas)
Incrementa la velocidad de absorción de nutrientes	Fosfopéptidos de caseína
Mejora la absorción de minerales	Fosfopéptidos de caseína
 Modulación hemodinámica	
Antihipertensión	Casoquininas (ACE-I; péptidos inhibidores de enzima Angiotensina)
Incrementa el flujo de sangre	Casoplatenina (péptidos de κ -caseína) Lactoferrina y péptidos
 Probióticos, soporte de flora intestinal	
Mejora el crecimiento de bifidobacterias en el tracto gastrointestinal	Glicomacropéptido de κ -caseína Oligosacáridos de leche, Casomorfina, lactoferrina y Péptidos de lactoferrina
 Protección contra enfermedades inmunológicas	
Destrucción de coliformes y bacterias patógenas del intestino y glándula mamaria	Péptidos bactericidas de lactoferrina
Inhibición de infecciones virales	Glicolípidos, esfingolípidos
 Inmunidad pasiva	
Favorece la capacidad fagocítica	Citoquininas
 Inmunoregulación	
Modulación de la diferenciación de linfocitos	Péptidos inmunoregulatorios de caseína Lactoferrina y péptidos de lactoferrina
Modulación de linfocitos e intercambio de los granulocitos	Citoquininas
 Antiinflamación	
Modulación de la función de linfocitos	Péptidos inmunoregulatorios de caseína
Reduce la liberación de citocinas por linfocitos y macrófagos	Lactoferrina y péptidos de lactoferrina
Modulación de respuesta polimorfonuclear de leucocitos	Citoquininas
 Crecimiento y desarrollo	
Elevación del desarrollo del tracto intestinal	Hormonas: prolactina, y otras en la leche
Elevación del desarrollo de la función gástrica	Factores de crecimiento: IGF, EGF
Mejora del desarrollo neuroendócrino	Citocinas
Aumento del desarrollo del sistema inmune	Péptidos inmunoregulatorios de caseína, lactoferrina

Los inmunopéptidos obtenidos de α -s₁, β - caseína y α -lactoalbúmina estimulan la actividad fagocitósica de los macrófagos humanos, protegiendo al organismo contra *Kleibsiella pneumoniae*. La isracidina, péptido originado de la hidrólisis de la α -s₁-caseína, ofrece protección contra *Staphilococcus aureus* y *Cándida albicans*; también se observó que favorece una mayor formación de anticuerpos y proliferación de linfocitos (Harsharnjit *et al*, 2000)

4.6.3 PÉPTIDOS ACARREADORES DE MINERALES

La secuencia de la caseína presenta varios residuos fosforiles y fosfopéptidos; en el intestino, estos fosfopéptidos forman compuestos solubles con el calcio, provocando una mejor absorción del calcio. Los caseinofosfopéptidos adicionados a pastas dentales pueden prevenir la desmineralización y ejercer un efecto anticariogénico. Los fosfopéptidos derivados de la caseína, forman sales organofosfatadas con trazas de elementos como Fe, Mn, Cu y Se, para funcionar como acarreadores, y han sido utilizados en el tratamiento de raquitismo (Smacchi y Gobetti, 2000).

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

Los caseinofosfopéptidos pueden inhibir la caries dental a través de la recalcificación del esmalte dental, razón por la cual se ha sugerido su aplicación en el tratamiento de enfermedades dentales (Swaisgoodt y *Clare*, 2000).

4.6.4 PÉPTIDOS ANTITROMBÓTICOS

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

Se han observado péptidos antitrombóticos en el plasma de infantes después de la ingesta de leche materna y después de la ingesta de fórmula láctea. Los péptidos obtenidos de la digestión intestinal pueden producir efectos locales sobre la región gastrintestinal, en la mucosa absorbente, o bien pueden entrar al torrente sanguíneo alcanzando los órganos vecinos. Sin embargo es difícil medir la absorción de los péptidos bioactivos, ya que es difícil detectarlos dentro del plasma (Meisel y Schlimme, 1990).

4.6.5 PÉPTIDOS BACTERICIDAS

Los péptidos bactericidas son derivados de la hidrólisis de lactoferrina. La lactoferrina es una glicoproteína transportadora de hierro presente en la leche. Se han encontrado alrededor de 30 secuencias diferentes de lactoferrina con N- terminal. La actividad antimicrobiana de la lactoferrina ha sido correlacionada con la carga neta positiva de la molécula y el alto contenido de residuos hidrofóbicos (Strom *et al*, 2000).

Estos péptidos eliminan microorganismos sensibles incrementando la permeabilidad de la membrana celular. Dionysius y Milne (1998), observaron la actividad bactericida de la lactoferrina en cepas de *E. coli* enterotoxigénica y en *Listeria monocitogenes*. Posteriormente se observó la actividad bactericida en cepas aisladas de *E. coli* enterohemorrágica. Las propiedades antifúngicas de la lactoferrina se demostraron con *Candida albicans*.

La casocidina I (residuos 165-203), fragmento de la α -s₂ caseína, contiene una alta proporción de residuos de aminoácidos básicos que inhiben el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus carnosus*. (Meisel *et al*, 1997)

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

La casocidina, obtenida por proteólisis con pepsina, tiene actividad contra *Bacillus subtilis*, *Diplococcus neumoniae* y *Streptococcus pyogenes* (Meisel, 2001)

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

4.6.6 PÉPTIDOS ANTIHIPERETENSIVOS (INHIBIDORES DE ACE)

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

Los péptidos inhibidores de ACE derivados de la leche, son diferentes fragmentos de caseínas, llamados casoquininas y los péptidos generados por las proteínas del suero son llamadas lactoquininas. Las casoquininas, altamente activas, son

fragmentos de α_{s1} -caseína (23-27) y β -caseína (177- 183) tienen un IC_{50} menor de 20 $\mu\text{m/l}$ (IC_{50} : Concentración de péptido que inhibe la actividad de ACE en un 50%). El fragmento opioide de la β - casomorfinina -7, exhibe una baja actividad inhibitoria de ACE, mientras que la β - lactorfina 5 presenta una actividad moderada.

4.7 PÉPTIDOS BIOACTIVOS EN LECHE FERMENTADAS

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

El tipo de cultivo usado es uno de los principales factores que influyen en el tipo de péptido bioactivo encontrado en leches fermentadas; por ejemplo, la proteólisis por *Lactobacillus helveticus* está relacionada con la producción de péptidos antihipertensivos.

Nakamura *et al.* (1995), purificaron péptidos inhibidores de ACE de una bebida japonesa fermentada con *Lb heleveticus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Los péptidos antihipertensivos, Val-Pro-Pro y Ile-Pro-Pro, los cuales son originados por hidrólisis de la α_{s1} - y β - caseína; han sido encontrados en leches fermentadas producidas por *Lb helveticus* CP790 (Meisel, 1998).

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

Una leche fermentada con *Lactobacillus GG* y posteriormente hidrolizada con pepsina y tripsina, presentó péptidos bioactivos que corresponden a fragmentos de α_{s1} - y β - caseína, y α -lactoalbúmina, con actividad inmunomoduladora, opioides y actividad inhibitoria de ACE. La producción de estos péptidos bioactivos podrían explicar parcialmente las propiedades probióticas atribuidas al *Lactobacillus GG* (Rokka *et al* 1997).

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

4.8 USO DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS EN ALIMENTOS FUNCIONALES Y FARMACÉUTICOS

Se ha observado que los péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche, ejercen un beneficio a la salud del consumidor.

Los péptidos derivados de caseína, pueden ser usados como suplementos alimenticios o como preparaciones farmacéuticas (fosfopéptidos y β -casomorfina (Reynolds, 1987).

Se ha considerado producir péptidos bioactivos como nutraceuticos (cualquier sustancia en el alimento que provee beneficios médicos o en la salud, incluyendo prevención y tratamiento de enfermedades) y como alimentos funcionales (aquellos que contienen sustancias que consumidos como parte de la dieta, regulan cierto proceso cuando son consumidos).

Se han planteado las siguientes opciones para el diseño de productos dietéticos y preparaciones farmacéuticas:

- * Suplementos dietéticos con péptidos bioactivos sintéticos específicos, pueden ser comercialmente preparados en concentrados deshidratados, utilizándolos en productos consumidos en la dieta como son: panes, pasteles, harinas, bebidas, preparaciones en tabletas y pastas dentales.
- * Producción de péptidos bioactivos durante el procesamiento de alimentos mediante el uso de microorganismos genéticamente modificados.
- * Incorporación de la codificación de genes para los péptidos, o la introducción de nuevos sitios susceptibles a la acción de proteasas, dentro del precursor mediante técnicas de ingeniería genética. Las mismas técnicas podrían ser usadas para eliminar actividades biológicas indeseables.
- * Administración de péptidos bioactivos como preparaciones farmacéuticas, por ejemplo, en el tratamiento de diarrea (casomorfina), padecimientos dentales, óseos y deficiencias en la absorción de minerales (caseinofosfopéptidos), e inmunodeficiencia (péptidos Inmunoestimuladores), etc.

5. MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

En este estudio se utilizaron 6 leches fermentadas comerciales, leches que sirvieron a lo largo del proyecto y que fueron seleccionadas por ser productos que contienen microorganismos probióticos. (Gilliland 1998; Salminen *et al.* 1998)

Las leches fermentadas utilizadas fueron:

- ⌘ Actimel: Bebida láctea fermentada, elaborada por Danone de México, S.A. de C.V. Contiene las cepas: *Lactobacillus casei* DN-114 001 y cultivos de yogurt
- ⌘ Chamyto: Producto lácteo fermentado, elaborado por Nestlé México, S.A de C.V., producido con *L. johnsonii* (*Lactobacillus acidophilus*)
- ⌘ LC1: Bebida láctea fermentada, producida por Nestlé de México, S.A de C.V., elaborado con : *L. johnsonii* (*Lactobacillus acidophilus*), y cultivos lácticos
- ⌘ Soful: Alimento lácteo fermentado, producido por Yakult de México con *Lactobacillus casei Shirota* y *Streptococcus thermophilus*
- ⌘ Yakult: Bebida láctea fermentada, elaborada por Yakult de México, con *Lactobacillus casei Shirota*.
- ⌘ Yogurt natural Danone: Elaborado por Danone de México S.A de CV. Contiene las cepas: *Lactobacillus delbrueckii sp bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*

La estrategia seguida durante la elaboración del proyecto fue la siguiente:

- I. Se realizaron fijaciones por la técnica de Gram para evidenciar la presencia de microorganismos en cada producto.
- II. Por la técnica de Kunitz (1947), se determinó la actividad proteolítica a cada producto comercial.
- III. Posteriormente con la técnica en placa de agar caseína (Molin y Törnstrom, 1982), se determinó la actividad proteolítica de cada producto.
- IV. Considerando las diferencias de los valores de actividad, se decidió realizar cuenta viable de cada producto comercial.
- V. Una vez determinada la cantidad de microorganismos de cada producto, se realizaron los cálculos respectivos de volumen de cada producto para inocular la misma cantidad de microorganismos en cada fermentación. Se realizaron las

fermentaciones respectivas y se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo. A cada muestra se le midió el pH y se determinó la cantidad de péptidos libres por el método de Lowry *et al*(1951).

Las técnicas utilizadas a lo largo de este trabajo se describen a continuación.

5.1 MORFOLOGÍA DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN LECHE FERMENTADAS COMERCIALES

La fijación de bacterias se realizó mediante la Tinción de Gram (Atlas, 1989). Las preparaciones se observaron al microscopio óptico (Olimpus BX 50 a 100, 200 y 1000x); y se capturaron las imágenes con el Analizador de imágenes Image Pro Plus.

5.2. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

La actividad proteolítica fue determinada con el método de Kunitz (1947), que se describe a continuación.

Reactivos:

- a) Solución de caseína (Merck) al 1% en solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 7.5
- b) Solución de ácido tricloro acético (J.T. Baker) al 5%

Procedimiento

Se prepararon tres series de tubos: 3 Blancos, 3 Testigos y 3 Tubos de reacción.

- * Los blancos se prepararon con 2 ml de la solución de caseína al 1% y se agregaron 3 ml de solución de ácido tricloroacético al 5%
- * A los tubos testigo se agregó 1.9 ml de solución de caseína al 1% + 3 ml de solución de ácido tricloroacético al 5%; finalmente se adicionó 0.1 ml del cultivo (leche fermentada).
- * Los tubos de reacción se prepararon con 1.9 ml de solución de caseína al 1%, se adicionó 0.1 ml del cultivo (leche fermentada) y se incubaron durante 20 minutos a 40⁰ C en un baño de temperatura controlada. La reacción fue detenida por adición de 3 ml de solución de ácido tricloroacético al 5%.

Todos los tubos (blancos, testigo y de reacción), se centrifugaron en una centrífuga Beckman J2 MI a 18000 rpm durante 15 minutos y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 280 nm en celdas de cuarzo en el espectrofotómetro Shimadzu UV-160 A.

Los resultados se trataron y se reportaron en UE/ml de cultivo. Una unidad de actividad enzimática (UE), fue definida como la cantidad de enzima que produce un aumento en 0.001 unidades de absorbancia por minuto

5.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN LECHE FERMENTADAS COMERCIALES EN PLACA DE AGAR- CASEÍNA

Se utilizó una técnica de rápida identificación en placa, la técnica de placa de agar de caseína (Molin y Ternoström, 1982), con la finalidad de conocer la actividad proteolítica de las leches fermentadas comerciales.

Reactivos:

- a) Agar bacteriológico (Bioxon) al 2%
- b) Leche descremada

Procedimiento

En un matraz Erlenmeyer de 250ml. se colocaron 100ml de agua destilada
En un matraz Erlenmeyer de 500 ml se colocaron 300 ml de agua y 6 g. de agar bacteriológico. Ambos matraces se esterilizaron a 121⁰C durante 15 min.

En el matraz Erlenmeyer de 250 ml con agua destilada estéril, se agregaron 8 g de leche descremada en condiciones de asepsia. El matraz se agitó y la leche se pasteurizó a 90⁰ C durante 5 min.

Posteriormente en condiciones de asepsia se incorporó la leche al agar, se homogenizó y se realizó el vaciado del medio en cajas de petri y éste solidificó a temperatura ambiente. Se sembraron e incubaron las leche fermentadas a 40⁰ C por 48 hrs. en jarra de anaerobiosis (BBL Gaspak anaerobyc system).

Después de la incubación, se realizó una aspersión con una solución de HgCl₂ al 10%.

La reacción positiva fue indicada mediante la generación de un halo alrededor de la muestra, como resultado de la degradación de las proteínas producidas por las cepas de las bacterias.

5.4. CUENTA VIABLE DE CULTIVOS LÁCTEOS

La técnica que se describe fue realizada para cada leche fermentada comercial.

Reactivos

- a) Medio de cultivo MRS
- b) Solución salina (NaCl al 0.85 %)

Procedimiento

En un matraz Erlenmeyer de 500 ml se colocaron 400 ml de agua, 22 g. de agar MRS y 8g de agar bacteriológico, se disolvieron perfectamente y se esterilizo el matraz a 121⁰C durante 15 min.

Se prepararon 10 tubos con solución salina y se esterilizaron a 121⁰C durante 15 min.

En los tubos con solución salina, se realizaron diluciones sucesivas de los productos comerciales (10^{-1} a 10^{-10}). De las diluciones correspondientes se tomó 1 ml y se deposito en cajas de petri; posteriormente se agregó el medio de cultivo y se agitó para mezclar perfectamente la muestra con el medio de cultivo.

Una vez solidificado el medio, se incubó a la temperatura óptima de cada microorganismo (tabla 5), por un tiempo de 24- 48 horas, en jarra de anaerobiosis (BBL Gaspak anaerobyc system).

Tabla 5. Temperaturas de Incubación

Producto	Temperatura de crecimiento
Actimel	37 ⁰ C
Chamyto	38 ⁰ C
LC1	38 ⁰ C
Soful	37 ⁰ C
Yakult	37 ⁰ C
Yogurt natural Danone	42 ⁰ C

Pasado el tiempo de incubación, se realizó la cuenta viable de los microorganismos

Los resultados se reportaron en UFC/ml. Que son las colonias formadas por 1 ml de muestra multiplicadas por el inverso de la dilución

5.5 CINÉTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PÉPTIDOS SOLUBLES.

Para poder determinar los péptidos solubles, se realizaron cinéticas de las leches fermentadas en leche descremadada, la metodología de dichas cinéticas se describe a continuación.

5.51. PREPARACIÓN DE LA LECHE

En un matraz Erlenmeyer de 250ml. se colocaron 100 ml de agua destilada, el matraz se esterilizó a 121⁰C durante 15 min.

En condiciones de asepsia, se agregaron 12 g de leche descremada al matraz Erlenmeyer de 250 ml con agua destilada estéril, el matraz se agitó y la leche se pasteurizó a 90⁰ C durante 5 min.

5.5.2. ADICIÓN DEL INÓCULO

Una vez determinada la cantidad de microorganismos viables en cada producto, se realizaron los cálculos respectivos para ajustar el volumen necesario de cada leche fermentada e inocular 1 x 10⁹ UFC/100 ml de leche preparada como se describe en la sección 5.5.1.

Los matraces se incubaron durante cinco horas a una temperatura de 40⁰C en baño de temperatura controlada. Se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo (0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 hrs).

5.5.3. DETERMINACIÓN DE PÉPTIDOS SOLUBLES PRODUCIDOS DURANTE LA FERMENTACIÓN

La determinación de péptidos solubles se realizó por el método de Lowry, para lo cual es necesario precipitar las proteínas de las muestras obtenidas durante la fermentación.

Reactivos

- a) Ácido tricloroacético (J.T. Baker) al 12%
- b) Na₂CO₃ (J.T. Baker) al 2% en NaOH (Reasol) 0.1N
- c) CuSO₄ (J.T. Baker) al 1% en H₂ O
- d) Tartrato de Na y K (J.T. Baker) al 2% en H₂ O
- e) Reactivo de Folin Ciocalteu (Sigma) 1:1 en agua

Procedimiento

Se tomaron dos mililitros de la muestra y se le agregaron 2 ml de solución de ácido tricloroacético al 12%, se centrifugó en una centrifuga Beckman J2-MI a 18000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se separo en tubos de 5 ml.

Haciendo la determinación de Lowry en las muestras sin proteína, se detecta la cantidad de péptidos solubles por el complejo proteína- cobre, atribuido al contenido de tirosinas y triptofanos (Lowry *et al*, 1951; Cheftel *et al*, 1995).

Una vez precipitadas las proteínas, se aplicó el método de Lowry que se describe a continuación.

De los sobrenadantes obtenidos, se realizaron diluciones 1:10.

Se mezclaron 50 volúmenes de b) + 1 volumen de c) + 1 volumen de d), de esta mezcla se tomaron 5 ml y se les agregó 1 ml de sobrenadantemuestra.

Después de dejar reposar 10 minutos, en la oscuridad, se agregaron 0.5 ml de reactivo e).

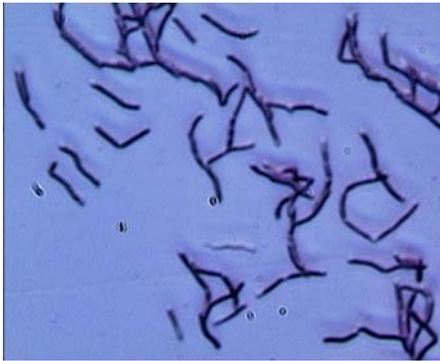
Finalmente se dejó reposar 30 minutos en la oscuridad y se leyó a $\lambda = 590$ nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 A.

La curva patrón se realizó a partir de una solución de 500 μ g/ml de seroalbúmina bovina (Sigma) que se diluyó a diferentes concentraciones (100, 200, 300, 400, 500 μ g /ml), para cubrir un intervalo de 0 a 500 μ g /ml, se siguió el mismo procedimiento que para las muestras.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. MICROORGANISMOS PRESENTES EN LECHE FERMENTADAS COMERCIALES.

De acuerdo con la técnica descrita en la sección 5.1, se observaron los siguientes microorganismos presentes en las leches fermentadas comerciales.



1000x



1000x

Fig 2. Microorganismos presentes en Actimel

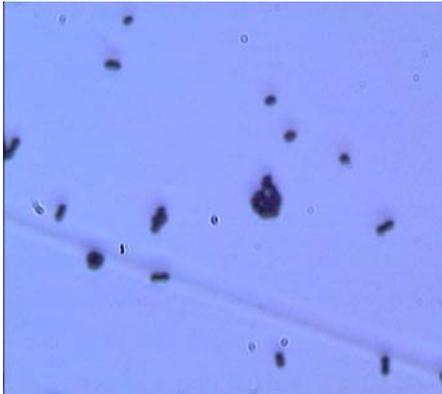
En Actimel (figura 2), se observaron dos tipos diferentes de lactobacilos, de acuerdo con el fabricante, Actimel presenta *L. casei defensis* y cultivos de yogurt. Reuter, (1997) y Holzapfel *et al* (1998); reportan la presencia de *L. casei* y *L. delbrueckii ssp bulgaricus* en este producto, por lo que los dos tipos de lactobacilos observados podrían ser los citados.



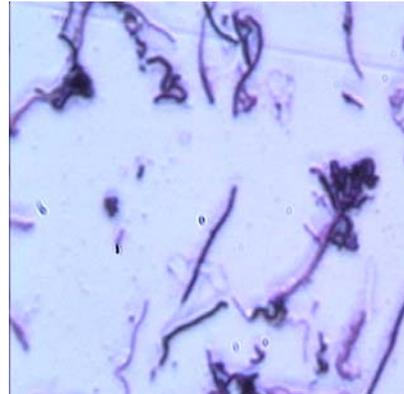
1000x

Fig 3. Microorganismos presentes en Chamyto

En el caso de Chamyto (figura 3), se observó un lactobacilo, el fabricante reporta el *L. acidophilus*, por lo que el lactobacilo encontrado puede ser el reportado por el fabricante.



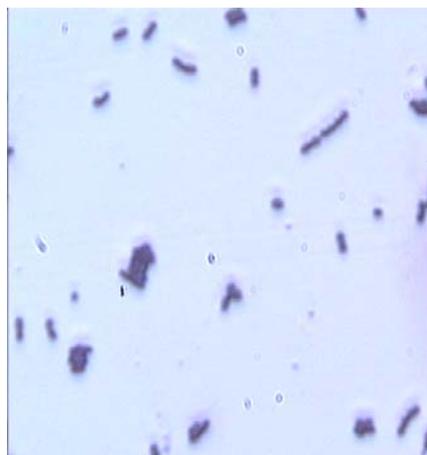
1000x



1000x

Fig 4. Microorganismos presentes en LC1

En LC1 (figura 4), se observaron 2 microorganismos, un lactobacilo y un coco. En este producto, el fabricante reporta la presencia de *L. johnsoni* y cultivos lácticos. Reuter (1997) y Holzapfel *et al* (1998), reportan la presencia de *L. johnsonii* y *S. thermophilus*, por lo que los microorganismos encontrados, corresponden a lo descrito por los autores y fabricante.



1000X

Fig 5. Microorganismos presentes en Soful

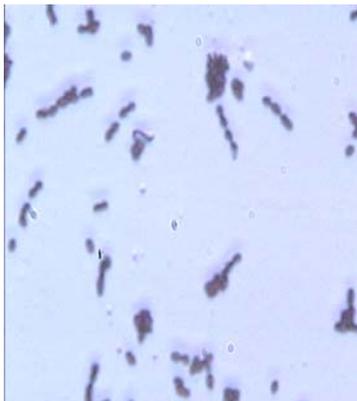
En Soful (figura 5), se observó sólo un coco, el fabricante reporta 2 cepas: *S. thermophilus* y *L. casei* Shirota. El fabricante reporta una relación de 90:10, siendo el *L. casei* el que tiene una mayor proporción, posiblemente las condiciones empleadas para el crecimiento no fueron favorables para el desarrollo del *L. casei*



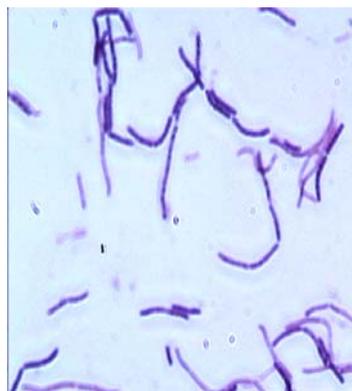
1000x

Fig. 6. Microorganismos presentes en Yakult.

En Yakult (figura 6), se observó un lactobacilo, el fabricante reporta *L. casei* Shirota. Reuter (1997) y Holzapfel *et al* (1998); reportan la presencia de *L. casei* en este producto



1000X



1000X

Fig 7. Microorganismos presentes en Yogurt natural Danone

En el yogurt natural Danone (figura 7), se observaron dos microorganismos diferentes un lactobacilo y un coco, que pueden ser *L. delbrueckii ssp bulgaricus* y *S. thermophilus*, microorganismos reportados por el fabricante.

6.2. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LECHE FERMENTADAS COMERCIALES

Se determinó la actividad proteolítica a las 6 leches fermentadas comerciales, inoculando en caseína, 20 min, como se describe en el método de Kunitz, (sección 5.2). Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Actividad proteolítica de leches fermentadas comerciales

Leche fermentada	Actividad Proteolítica (UE/ ml)
Yogurt natural Danone	116
LC1	68
Soful	60
Actimel	57
Yakult	0
Chamyto	0

El producto que presentó mayor actividad proteolítica es el Yogurt natural Danone. Los microorganismos del yogurt han sido ampliamente estudiados, observando que estas bacterias (*S. thermophilus* y *L. delbrueckii ssp bulgaricus*) Son más proteolíticas que las bacterias probióticas (Shihata y Shah, 2000).

En el caso de productos como LC1 , Soful y Actimel, es importante mencionar que poseen microorganismos del yogurt.

Reuter (1997) y Holzapfel *et al* (1998), reportan que LC1, contiene *S. thermophilus* y *L. acidophilus*. Shihata y Shah (2000), mencionan que *L. acidophilus* crece lentamente en leche por carecer de actividad proteolítica, por lo que la práctica común es adicionar bacterias del yogurt (*S. thermophilus* y *L. delbrueckii ssp bulgaricus*). La presencia de *S. thermophilus*, puede ser la razón por la que este producto presenta actividad proteolítica. Chavagnat *et al* (2000), estudiaron el sistema proteolítico de *S. thermophilus*, el cual presenta una importante actividad, que se encontraron al menos 14 peptidasas que participan en la maduración de quesos.

Soful presentó una importante actividad proteolítica. Este producto contiene *L. casei Shirota* y *S. thermophilus*, reportados por el fabricante. Martínez *et al* (2001), estudiaron una cepa de *L. casei*, encontrando una muy buena actividad proteolítica en esta cepa, hallaron proteasas de la pared celular, aminopeptidasas, dipeptidasas y peptidasas especializadas para péptidos con prolina. Cabe mencionar que la actividad proteolítica varía de una cepa a otra aún siendo de la misma especie, por lo que no se puede asegurar que en Soful, la actividad proteolítica se presente por el *L. casei*, ya que en Yakult, producto que contiene la misma cepa (*L. casei Shirota*), no se observó actividad proteolítica. Sin embargo, en Soful la presencia de *S. thermophilus* que es un microorganismo del yogurt, es el que podría generar la actividad proteolítica en el producto

Actimel contiene *L. casei* y *L. delbrueckii ssp bulgaricus*, con base en lo publicado por Reuter (1997), Holzapfel *et al* (1998) y los resultados obtenidos en la sección 6.1. En este producto, el valor de la actividad proteolítica podría presentarse por el *L. delbrueckii ssp bulgaricus*, ya que este microorganismo posee sistemas proteolíticos muy activos (Feller *et al* 1990).

Chamyto, el cual contiene *L. acidophilus*, no presentó actividad proteolítica. Posiblemente el producto no estaba en óptimas condiciones. De acuerdo con Shah (2000), Nighswonger *et al* (1996), muchos tipos de *L. acidophilus* no crecen en leche y sobreviven poco en productos fermentados, ya que puede ser estable por más de una semana sólo si es tratado adecuadamente.

Gilliland (1998), reportan que la viabilidad de *L. acidophilus* y su actividad enzimática disminuye marcadamente durante el almacenamiento.

Yakult contiene *L. casei*, según Reuter (1997), Holzapfel *et al* (1998) y los resultados obtenidos en la sección 6.1. Este producto no mostró actividad proteolítica. Fernández de Palencia *et al* (1997) y Fernández *et al* (1997), purificaron y caracterizaron una proteinasa de la pared celular y una prolidasa de una cepa de *L. casei* respectivamente. Es importante enfatizar que la actividad proteolítica varía de una cepa a otra aún siendo de la misma especie, por lo que no se puede asegurar que esta cepa genere actividad proteolítica.

Torrez M. (2003), reporta que en un estudio realizado a leches fermentadas se observó que los productos no eran distribuidos en óptimas condiciones, ya que no eran almacenados a temperaturas adecuadas, lo que provoca una disminución en la cuenta microbiana de los productos, lo cual es muy importante de considerar, ya que los productos fermentados comerciales que en este proyecto han sido utilizados, podrían presentar una menor actividad proteolítica por esta causa.

Es importante señalar que en los productos que presentan microorganismos de yogurt como son: Actimel y yogurt natural Danone (con el *L. delbrueckii ssp*

bulgaricus) y LC1, Soful y yogurt natural Danone (con el *S. thermophilus*), se encontró mayor actividad proteolítica.

Ohmiya *et al* (1978), estudiaron proteasas intracelulares de *L. delbrueckii ssp bulgaricus* y *L. helveticus*, encontraron una amplia variación en la proteólisis de la caseína y en los fragmentos de caseína derivados de las diferentes cepas.

Hickey *et al* (1983) y Ezzat *et al* (1985), encontraron diferencia entre cepas de *L. delbrueckii ssp bulgaricus* cuando determinaron actividad proteolítica con diferentes técnicas.

Singh *et al* (1983), monitorearon 10 cepas de *L. delbrueckii ssp bulgaricus* en agar de caseína, 4 de ellas, exhibieron un alto grado de proteólisis y 6 mostraron niveles mucho más bajos.

Ayres *et al* (1988), observaron variación en la cantidad de tirosina liberada por la actividad proteolítica de cepas de *L. delbrueckii ssp bulgaricus*.

Oberg *et al* (1991) Shihata y Shah (2000), encontraron variación en la actividad proteolítica en cepas de *L. delbrueckii ssp bulgaricus*; cuando se monitoreo actividad proteolítica

Guimont (2002), Shihata y Shah (2002) en cepas de *S. thermophilus*; cuando se realizaron fermentaciones con 6 cepas diferentes

Nighswonger *et al* (1996), estudio la actividad proteolítica de *L. acidophilus*; encontrando disminución de la actividad durante el almacenamiento del producto

Shihata y Shah (2000) realizaron un estudio de la actividad proteolítica de 11 cepas de este microorganismo, encontrando diferencias importantes entre cepas.

Parra *et al* (2000) en cepas de *L. casei* , monitorearon la actividad proteolítica de este microorganismo en la maduración de un queso de cabra, encontraron buenos resultados cuando este microorganismo se agregaba al cultivo iniciador.

De lo anterior, se considera que la actividad proteolítica no puede ser atribuida a algún microorganismo en particular, ya que la actividad es variable. por la gran diversidad de cepas entre microorganismos de la misma especie.

Es importante considerar que el método utilizado en este experimento sólo nos permite evaluar dicha actividad en un intervalo muy corto de tiempo (20 min), además la cantidad de muestra es muy pequeña (0.1 ml) y cuando se agrego el inóculo del producto comercial, no se trataba de enzimas puras de los microorganismos, sino de una combinación de los componentes propios del producto entre ellos: grasa, leche, azúcares, saborizantes, colorante, gellanato, etc. Por lo que

cabe mencionar que esta técnica fue preliminar, ya que se consideró importante establecer si los cultivos presentes en los productos eran capaces de liberar proteasas.

6.3. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LECHE FERMENTADAS COMERCIALES EN PLACA DE AGAR CASEÍNA

La determinación de producción de proteasas se realizó con la técnica de placa de agar con leche descremada (sección 5.3). Dicha hidrólisis se aprecia a través de la formación de halos alrededor de la colonia, lo que indica actividad proteolítica de los microorganismos presentes en las leches fermentadas comerciales. Los resultados se muestran en las figura 8

LC1 y yogurt natural de Danone presentaron halo alrededor de la colonia. Estos resultados sirven para confirmar los resultados obtenidos en la sección 6.2, donde se observa que los productos con mayor actividad proteolítica por la técnica de Kunitz fueron Yogurt natural de Danone y LC1.

Los halos observados con Yogurt natural Danone y LC1 son más pequeños que los observados con otros microorganismos que liberan las proteasas en el medio, como las pseudomonas (Martínez, 2001), ya que las proteasas de las bacterias ácido lácticas se encuentran ligadas a la pared celular.



Fig. 8 Determinación de la actividad proteolítica de leches fermentadas comerciales en placa de agar-caseína

En el caso de Yakult y Chamyto no se observó crecimiento por lo que es posible que se necesite mayor tiempo de incubación, para observar crecimiento y actividad en placa de agar-caseína, debido a que es un microorganismo que crece muy lentamente.

En el caso de Soful y Actimel no se observó actividad proteolítica, posiblemente incubando un tiempo mayor, la actividad se hubiera reflejado, ya que en los resultados de la sección 6.2, estos productos muestran actividad.

6.4 CUENTA VIABLE DE CULTIVOS LÁCTEOS

Se realizó la cuenta viable de las leches fermentadas, con la técnica descrita en la sección 5.4. Los resultados se muestran en la tabla 8

Tabla 7. Cuenta viable de leches fermentadas

Leche fermentada	Actimel	Chamyto	LC1	Soful	Yakult	Yogurt natural Danone
UFC / ml	3.8×10^8	0.2×10^8	1.1×10^8	10×10^8	2×10^8	16.3×10^8

Las cuentas microbiológicas, muestran que todas las leches fermentadas comerciales presentan una cantidad mayor de 10^6 ufc/ml, cantidad sugerida para ejercer algún efecto probiótico (Shah, 2000)

6.5. CINÉTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PÉPTIDOS SOLUBLES

La determinación de péptidos solubles, se realizó por el método de Lowry *et al* (1951), como se describe en la sección 5.5 . Los resultados se muestran en las figuras 9, 10, 11, 12, 13.

Actimel (figura 9), presentó una tendencia de aumento de péptidos solubles, obteniendo un valor máximo a las 4 hrs de fermentación y posteriormente este valor disminuyó hasta 0.4 mg/ml a las 5 hrs de fermentación.

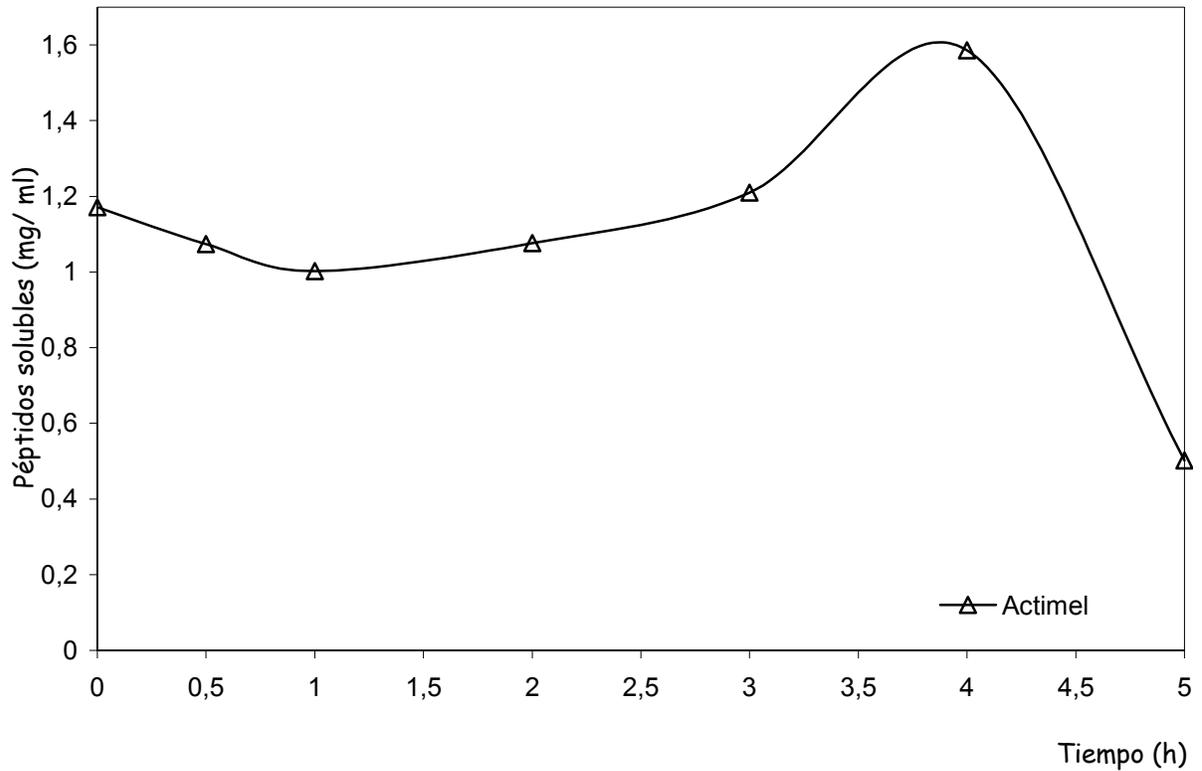


Fig. 9 Evaluación de los péptidos solubles producidos durante la fermentación de leche descremada (12% S.T.) inoculada con Actimel (1×10^9 UFC/100 ml) a 40° C

LC1 (figura 10), mostró una disminución en la cantidad de péptidos solubles durante la primer hora de fermentación, posteriormente la tendencia es de aumento en la cantidad de péptidos a excepción de las 3 y 5hrs, donde se observa una disminución de péptidos.

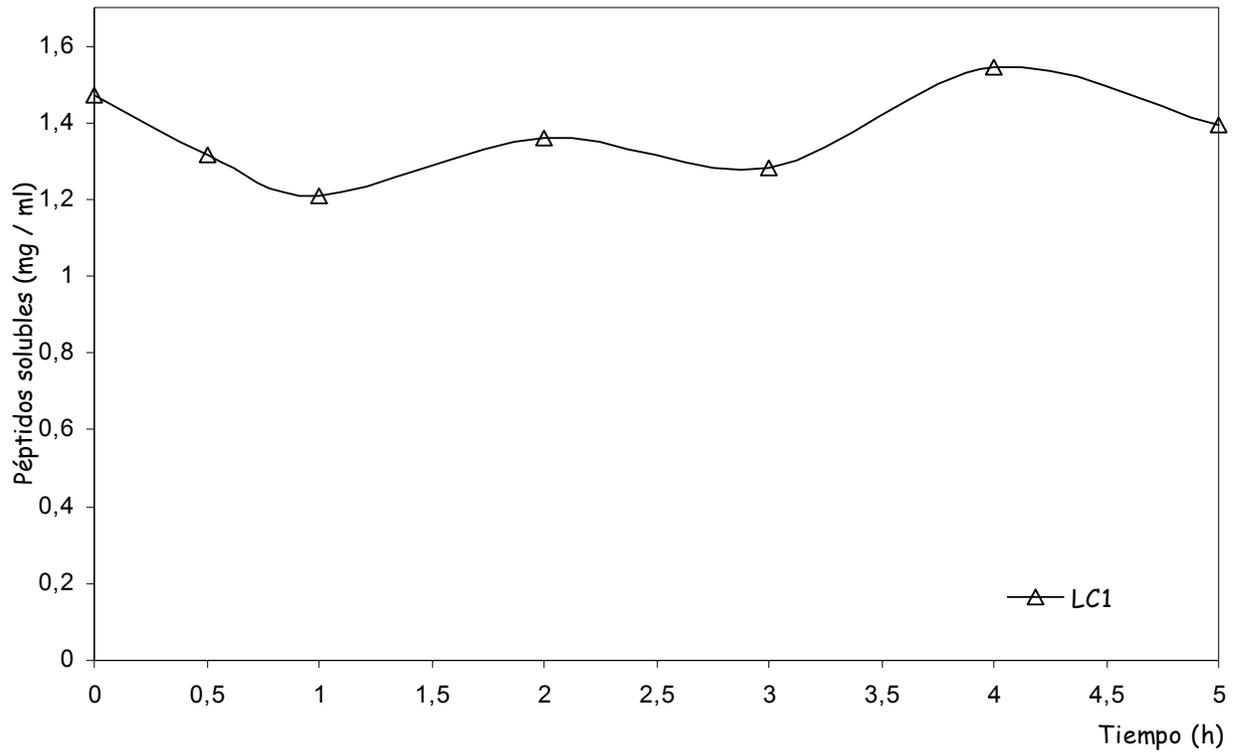


Fig. 10 Evaluación de los péptidos solubles producidos durante la fermentación de leche descremada (12% S.T.) inoculada con LC1 (1×10^9 UFC/100 ml) a 40^0 C

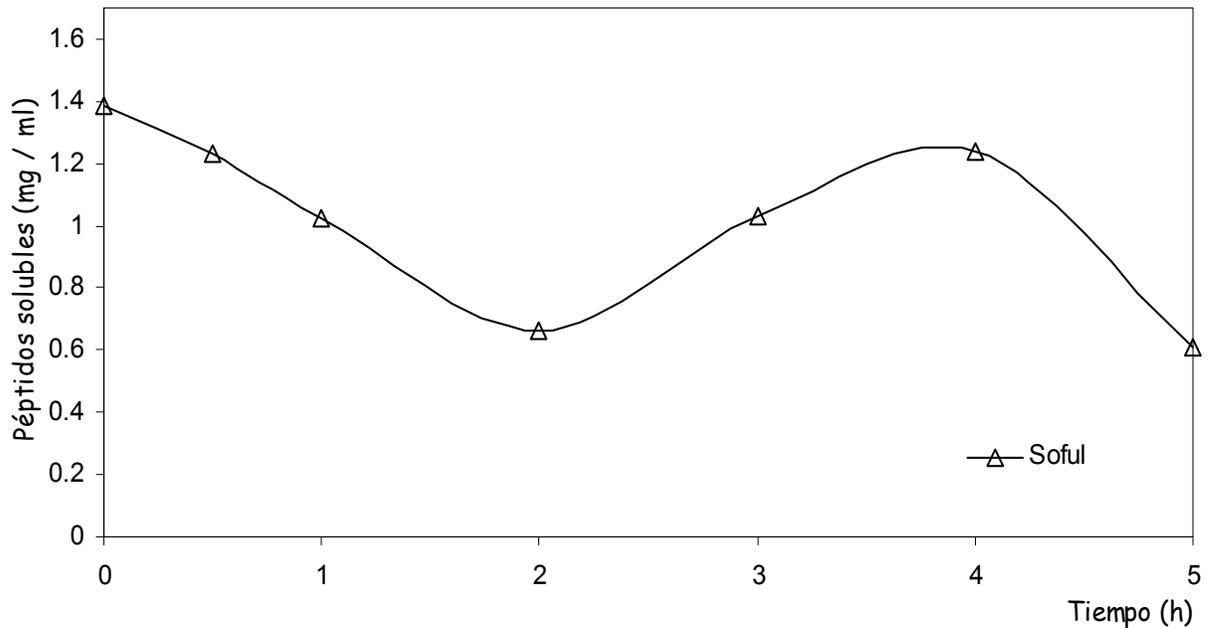


Fig. 11 Evaluación de los péptidos solubles producidos durante la fermentación de leche descremada (12% S.T.) inoculada con Soful (1×10^9 UFC/100 ml) a 40° C

En Soful (figura 11) hay consumo de péptidos solubles en las primeras dos horas de fermentación, a partir de las dos hrs., se puede apreciar un aumento del mismo hasta las 4 hrs. Donde, posteriormente disminuye la concentración de péptidos solubles en el medio.

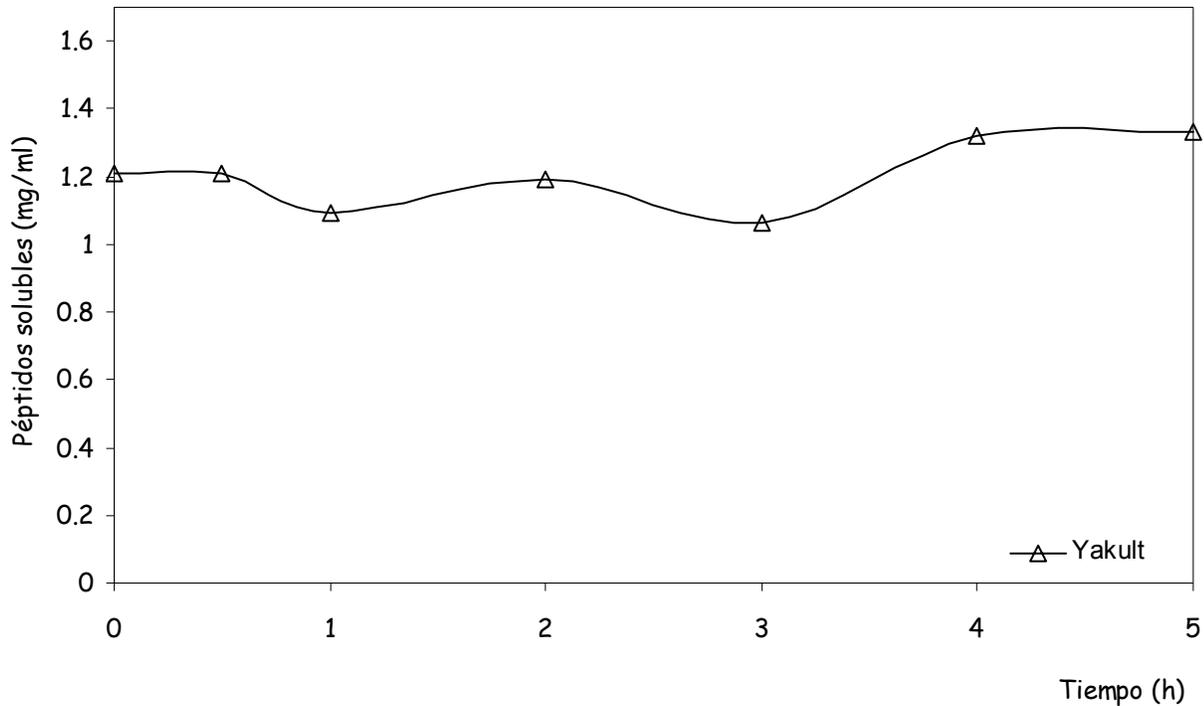


Fig. 12 Evaluación de los péptidos solubles producidos durante la fermentación de leche descremada (12% S.T.) inoculada con Yakult (1×10^9 UFC/100 ml) a 40°C

En Yakult (figura 12), la tendencia en cuanto al contenido de péptidos solubles no es clara. Las condiciones de crecimiento, no fueron las adecuadas para este microorganismo, en el Manual de Bergey (1978), se menciona que la temperatura optima de crecimiento de este microorganismo 37°C , además las condiciones de oxígeno tampoco fueron las adecuadas, ya que este microorganismo crece en ausencia de oxígeno.

En Yogurt natural Danone (figura 13), se observó generación péptidos solubles durante las primeras 4 hrs. de 1.4 mg/ml, posteriormente este valor descendió hasta 1mg/ml.

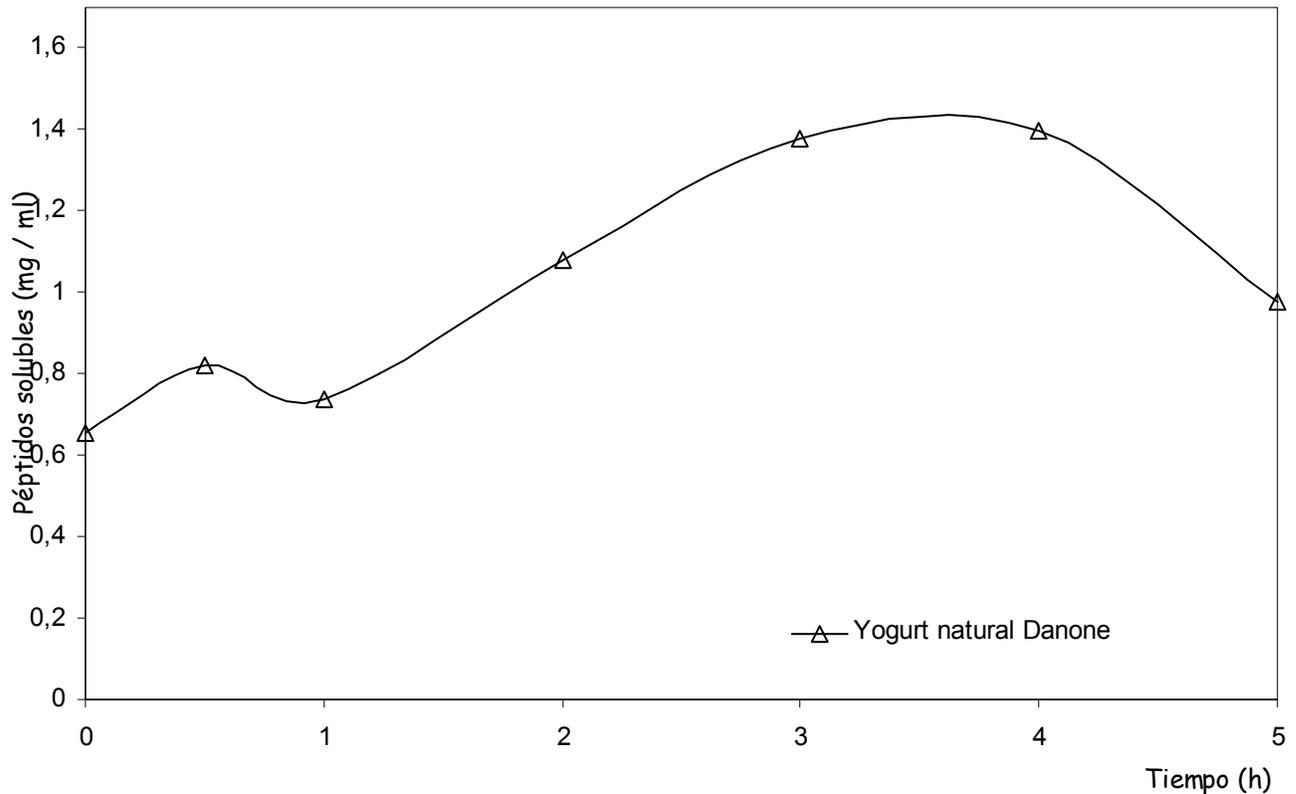


Fig. 13 Evaluación de los péptidos solubles producidos durante la fermentación de leche descremada (12% S.T.) inoculada con Yogurt natural Danone (1×10^9 UFC/100 ml) a 40° C

Las cinéticas realizadas de las leches fermentadas comerciales, presentan diferencias importantes. En todos los productos se observa claramente: etapa de generación, etapa de consumo y etapa de acumulación. Las etapas antes mencionadas, varían en cada producto en tiempo y cantidad de péptidos solubles.

En Actimel (figura 9) y en yogurt natural Danone (figura 13), el tiempo de generación máximo coincide para ambos productos, a las 4 hrs de fermentación. En Soful (figura 11) y LC1 (figura 12), se observa que a las 4 hrs de fermentación hay también una generación de péptidos, considerando que en ambos productos se observa consumo de péptidos solubles.

Juillard *et al*, (1995), Beshkova *et al*, (1998), Guimont (2002), Zourari *et al*, (1992) y Fadda *et al*, (2001); encontraron un evidente consumo de aminoácidos durante la fase de crecimiento de las bacterias lácticas, motivo por el cual la liberación de péptidos solubles se ve disminuido durante la fase exponencial de crecimiento, después de esta fase, en la fase de declinación o muerte bacteriana, puede presentarse una acumulación péptidos.

En leches fermentadas con *S. thermophilus* y *L. delbrueckii ssp bulgaricus*, se observó un consumo de los péptidos generados durante la fermentación. Beshkova *et al*, (1998), reportaron que después de la fermentación, alrededor del 70% de los aminoácidos disminuyen. *S. thermophilus* posee una capacidad proteolítica baja y consume alrededor del 70% de los péptidos libres (en forma de aminoácidos) generados por *L. delbrueckii ssp bulgaricus* en el proceso de coagulación de la leche en cultivos mixtos.

También es importante señalar que la concentración de aminoácidos es resultado del equilibrio entre la proteólisis y la asimilación por las bacterias ácido lácticas, ya que algunos aminoácidos o péptidos no son necesarios para éstas y son acumulados en el medio en cantidades superiores al resto de los aminoácidos que sí son metabolizados por las bacterias ácido lácticas durante el crecimiento (Leclerc *et al*, 2002).

En cuanto al sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas, se sabe que existe una marcada diferencia entre el sistema de los lactobacilos y el de los estreptococos. Se ha observado que los lactobacilos presentan capacidad proteásica mayor que los cocos, mientras que los cocos presentan capacidad peptidásica mayor que los lactobacilos (Tamine y Robinson, 1991; Chavagnat *et al* 2000).

La diferencia en cantidades de péptidos durante la fermentación puede deberse a las diferentes proteasas de las cepas y a que dicha actividad varía entre una cepa y otra, así como a la presencia de cultivos mixtos (Leclerc *et al*, 2002; Di Cagno *et al*, 2003).

De acuerdo con Shihata y Shah, (2000) las bacterias del yogurt (*S. thermophilus* y *L. delbrueckii ssp bulgaricus*), son más proteolíticas en comparación que algunas bacterias probióticas, entre ellas *L. acidophilus*. Las bacterias del yogurt liberan una gran cantidad de aminoácidos y muestran una gran actividad aminopeptidasa mayor que las bacterias probióticas, como resultado, las bacterias del yogurt crecen más rápido, generando mayor cantidad de péptidos durante su crecimiento, mientras que las bacterias probióticas requieren de adición de péptidos y aminoácidos para un óptimo crecimiento, en particular en cultivos que no contienen *L. delbrueckii ssp bulgaricus*. En los resultados obtenidos, de la evaluación de péptidos solubles, los productos que muestran la tendencia de generación durante la fermentación, son precisamente los que contienen *L. delbrueckii ssp bulgaricus* como son Actimel (figura 9) y Yogurt natural Danone (figura 13).

Es importante no olvidar que la actividad proteolítica varía en cepas de la misma especie, por lo que no se puede establecer que algún microorganismo en común presente en las leches fermentadas sea el que genere mayor cantidad de péptidos solubles. Shihat y Shah (2000), realizaron un estudio con 9 cepas de *S.thermophilus*, de las cuales 3 no mostraron actividad proteolítica en las mismas condiciones de trabajo, 6 cepas de *L. delbrueckii ssp bulgaricus*, de las cuales una no tuvo actividad proteolítica y 12 cepas de *L. acidophilus*, dos de ellas no mostraron actividad; a las diferentes cepas les determinaron actividad proteolítica, observando en ocasiones mayor variación entre cepas de la misma especie que entre cepas de diferentes especies, por lo cual no es posible afirmar que la actividad proteolítica en las leches fermentadas comerciales esté dada por algún microorganismo en particular. En el mismo estudio, evaluaron 10 cepas de bifidobacterias de las cuales solo 3 presentaron actividad proteolítica, confirmando el hecho de que la mayoría de las cepas clasificadas como típicamente probióticas en general presentan menor actividad proteolítica.

7. CONCLUSIONES

Se estudió la actividad proteolítica de diferentes cultivos probióticos para conocer su potencial en cuanto a la producción de péptidos bioactivos durante la elaboración de leches fermentadas.

Los microorganismos presentes en cada leche fermentada comercial corresponden a los declarados por el fabricante

Las leches fermentadas comerciales mostraron actividad proteolítica, observando una mayor actividad en los productos que contienen microorganismos del yogurt. Las leches fermentadas comerciales con mayor actividad proteolítica, son en orden de importancia:

Yogurt natural Danone >> LC1 > Soful > Actimel

Cabe mencionar que el método utilizado presentó dificultades para determinar la actividad proteolítica, ya este método es utilizado generalmente en soluciones enzimáticas, en nuestro caso, se utilizó en productos que contenían además de las enzimas, microorganismos, proteínas, lípidos y azúcares.

La cuenta viable de cada producto permitió conocer la cantidad de microorganismos presentes en cada producto, observando que las leches fermentadas comerciales estudiadas, poseen el número de microorganismos necesarios para ejercer efecto probiótico (10^7 - 10^9 UFC/ml)

La liberación de péptidos solubles de las leches fermentadas comerciales presenta diferencias importantes, ya que varía en cada producto, aún cuando éstos presentan cepas en común. Desde el punto de vista de generación de péptidos, los productos que mayor generación presentan son: Yogurt natural de Danone, Actimel, LC1, Soful, En el caso de Yakult y Chamyto, las condiciones en el estudio no fueron las más adecuadas para observar la actividad proteolítica evaluada por las diferentes técnicas.

Los péptidos solubles generados por los productos comerciales dependen de factores complejos entre ellos, la cantidad de leche presente en la leche fermentada, la asimilación de aminoácidos de los cultivos, la interacción entre mezclas de cultivos, etc.

Dado que el interés de este estudio radica en la liberación de los péptidos formados por la hidrólisis de las proteínas de la leche por las proteasas de las bacterias ácido lácticas, los productos que mejores resultados revelan en este sentido son los que presentan microorganismos del yogurt: Actimel, LC1, Yogurt Natural Danone y Soful.

Este estudio permitió reflexionar sobre la importancia de algunos de los conocidos efectos probióticos de bacterias ácido lácticas, ya que éstos pueden estar relacionados con la presencia de péptidos bioactivos, lo que hace necesario identificar y caracterizar los péptidos liberados durante la hidrólisis de proteínas en las leches fermentadas comerciales.

Es importante señalar que el estudio de mezclas de microorganismos es complejo, ya que la actividad proteolítica esta fuertemente involucrada en la nutrición y en las interacciones entre las bacterias para complementar sus capacidades enzimáticas y así cubrir sus necesidades de crecimiento. Por lo que se sugiere un estudio más completo a través de técnicas más finas, ésto con la finalidad de conocer que bacterias ácido lácticas presentan una mayor actividad proteolítica y puedan ser las más utilizadas para la generación de péptidos bioactivos

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aso Y., and Akazan H., BLP Study Group. (1998). Prophylactic effect of *Lactobacillus casei* preparation of the recurrence of superficial bladder cancer. *Urology* 49:125-129
- Atlas, M. (1989). *Microbiology fundamentals and applications Part 1*, Macmillan publishing company, Pp 29, 101-102.
- Ayres, J., Khoshari. L., Rajagopal N., Matalon M., and Sandine E. (1988). Studies on thermophilic rod- coccus bulk starter media. Proc 8th. Bienn. Cheese Industrial Confederation Utah State Univ. Logan.
- Baricault L., Denariáz G., Houn J., Bouley C., Sapin C., and Trogam G. (1995). Use of HT-29, a cultured human colon cell line to study the effect of fermented milks on cancer cell growth and differentiation. *Carcinogenesis* 16: 245-252.
- Bensussan N. (2002). New insight into the direct role of lactic acid bacteria in lactose digestion. *Yoghurt & fermented milks Letter* n° 8. p 1.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1978). Eight edition. Edit. Williams and Wilkins.
- Beshkova D., Simova E., Frengova G., and Simov Z. (1998). Production of amino acids by yogurt bacteria. *Biotechnology Prog.* 14, 963-965.
- Brody, E.P. (2000), Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition* 83 (suppl. 1), 39-46.
- Bruneval, P., Hinglais, N. and Alhenc-Gelas, F. (1986) Angiotensin I converting enzyme in human intestine and kidney. Ultrastructural immunohistochemical localization. *Histochemistry* 86, 73-80.
- Cross M.L., Stevenson, H.S., and Gill H.S. (2001). Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria?. *International Immunopharmacology* 1, 891
- Chavagnat F., Meyer J., and Casey M.G. (2000). Purification, characterization, cloning and sequencing of the gene encoding oligopeptidase PepO from *Streptococcus thermophilus* A. *FEMS microbiology letters* 191, 79-85.
- Cheftel J., Cuq J., and Lorient D. (1985). *Proteines Alimentaries*. Lavoisier Tec and Doc.
- Dekker M, (2001). *Applied Dairy Microbiology*, 2nd Edition. Edited by Elemer H. Marth.
- Di Cagno R., Angelis M., Upadhyay V., McSweeney P., Minervini F., Gallo G., and Gobbetti M. (2003). Effect of proteinases of starter bacteria on the growth and proteolytic activity of *Lactobacillus plantarum* DPC2741. *International Journal* 13, 145 - 157
- Dionysius, D.A. and Milne J.M. (1998), Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization, *Journal Dairy Science* 80, 664-674.

-
- Ezzat N., El Soda M., Bouillane C., Zevaco C., and Blanchard P. (1985). Cell wall associated proteinases in *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactococcus lactis*. *Milchwissenschaft*
 - Fadda S., Vignolo G., Aristoy M., Oliver G., and Toldrá F. (2001) Effect of curing conditions and *Lactobacillus casei* CRL705 on the hydrolysis of meat proteins. *Journal of Applied Microbiology* 91, 478- 487.
 - Fernández de Palencia P., Peláez C., Romero C., and Hernández M. (1997). Purification and characterization of the cell wall proteinase of *Lactobacillus casei subsp casei* IFPL 731 isolated from raw goat's milk cheese. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 45, 3401-3405.
 - Fernández M., Hernández M., and Fox P. (1997). Purification and characterization of a prolidase from *Lactobacillus casei subsp casei* IFPL 731. *Applied and environmental Microbiology* Jan, pp 314-316.
 - Ganjam, L.S., Thornton, W.H., R.T. and Mac Donald, R. S. (1997) Antiproliferative effects of yogurt fractions obtained by membrane dialysis on cultured mammalian intestinal cells. *Journal Dairy Science*. 80. 2325-2329
 - García-Garibay M. (1993). Productos lácteos en: *Biología Alimentaria* 1ª Edición, Edit. Limusa pp 162 – 191.
 - García - Garibay M. (2003). La leche como alimento funcional 3er. Simposio mexicano de probióticos.
 - Gill H., Rutherford K. Cross M., and Gopal P. (2001). Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HNO19. *British Journal Nutrition* 83, 166- 176.
 - Gilliland S.E. (1998). Fermented milks and probiotics. En: *Applied Dairy Microbiology* (Marth E.H. y Steele J.L., eds.) Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 195-212.
 - Guandalini S, Pensabene L ,Zikri MA , Dias JA, and Casali LG. (2000). *Lactobacillus GG* administered in oral rehydration solution in children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *Journal Pediatric Gastroenterology Nutrition* 30(2): 214-16
 - Guarner F. (2002). Probiotics in inflammatory bowel diseases. *Yoghurt & fermented milks: benefits of live cultures International symposium*. Paris, 25 september 2002
 - Guimont Ch. (2002). Change of free amino acids in M17 medium after growth of *Streptococcus thermophilus* and identification of glutamine transport ATP – binding protein. *International Dairy Journal* 12, 729 - 736
 - Harsharnjit S., Doull F., Rutherford K., and Cross M., (2000) Immunoregulatory peptides in bovine milk. *British Journal of Nutrition* 84 Suppl S111- S117.
 - Hickey M. Hillier A., and Jago G., (1983). Peptidase activities in lactobacilli. *Australian Journal . Dairy Technology*, 38: 118
 - Holzapfel W.H.J. P., Snel J. Schillinger U., and Huis in't Veld (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal Food Microbiology* 41:85-101

-
- Juillard V., Dominique L., Kunji E., Konings W., Grpon J.C., and Richard J. (1995). Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during Growth in milk. Applied and Environmental Microbiology, Aug 1995, p. 3024 – 3030.
 - Kalantzopoulos G. (1997) Fermented Products with Probiotic Qualities. Anaerobe 3, 185- 190.
 - Kitts D., and Yuan Y., (1992) Caseinophosphopeptides and Calcium Bioavailability Trends in Food Science & Technology. February 1992 Vol 3.
 - Klavet, F.A.M., Kingma, F., and Weerkamp, A.H. (1993). Growth and in milk survival of bifidobacteria in milk. Netherlands Milk and Dairy Journal 47, 151-164.
 - Kok J., and De Vos W. (1994). The proteolytic system of lactic acid bacteria en Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. Edited by Blackie academic & Professional.
 - Kranenburg R., Kleerebezem M., Vlieg J., Ursing B., Boekhorst J., Smit A., Ayad E., Smit g., and Siezen R. (2002). Flavour formation from amino acid by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. International Dairy Journal 12, 111- 121
 - Kunitz M, (1947), Journal . G. Physiol., 30, 29
 - Leclerc P., Gauthier S., Bachelard H., and Santure D. (2002). Antihypertensive activity of casein enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. International Dairy Journal 12 995 – 1004
 - Lowry O.H., Rosebrough N., Farr A.L., and Randall R.J., (1951). Protein cuantification. Journal Biology Chemistry. 193: 265
 - Martínez C., Fernández P., Requena T., and Peláez C. (2001). Enzymatic ability of *Lactobacillus casei subsp casei* IFPL 731 for flavour development in cheese. International Dairy Journal 11 577 - 585
 - Martínez T., (2001) Caracterización parcial de la producción y actividad de un extracto proteolítico producido por pseudomonas putida (C54) aislada de carne de pollo. Teis de licenciatura.
 - Mastretta E, Longo P, Laccisaglia A, Balbo L, and Russo R (2002). Effect of *Lactobacillus* GG and breast-feeding in the prevention of rotavirus nosocomial infection. Journal Pediatric Gastroenterology Nutrition, 5(4): 527-531
 - Meisel, H., and Schlimme, E, (1990) Milk proteins; Precursors of bioactive peptides. Trends in Food Science. V., 41-43
 - Meisel H. (1993). Casokinins as inhibitors of ACE in Sawatzk. G and Re B. (Eds). New perspectives in infant nutrition (pp 153-159). Thieme Stuttgart N.Y.
 - Meisel, H., Goepfert, A. and Günther, S (1997) ACE inhibitory activities in milk products. Milchwissenschaft 52, 307-311
 - Meisel H. (1998). Overview on milk protein. Derived peptides International Dairy Journal 8: 363-373.
 - Meisel H., and Bockelmann W. (1999). Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropo.functional properties. Antonie van Leeuwenhoek 76: 207-215.

-
- Meisel, H. (2001). Bioactive peptides from milk proteins: a perspective for consumers and producers. The Australian Journal of Dairy technology. July Vol 56, No. 2.
 - Molin G., and Ternström A. (1982). Numerical Taxonomy of psychrotrophic pseudomonads. Journal General Microbiology 128: 1249-1264
 - Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S. and Tacaño, T. (1995) Purification and characterization of angiotensin- I- converting enzyme inhibitors from sour milk. Journal Dairy Science 8, 777-783.
 - Nighswonger B., Brashears M., Gilliland S. (1996). Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. Journal Dairy Science 79: 212 – 219.
 - Oberg C., Weimer B., Moyes L., Brown R., and Richardson G. (1991). Proteolytic characterization of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* strains by the o- phthaldialdehyde test and Aminoacid analysis. Journal Dairy Science, 74: 398- 403
 - Ohmiya K., and Sato Y. (1978). Hydrolysis of casein by intracellular proteases from lactic acid bacteria. Agric. Biol. Chem. 33: 669
 - Ostlie H., Helland M., and Narvhus J. (2003). Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. International Journal of Food Microbiology 2695 1-11
 - Parra L., Casal V., and Gómez R. (2000). Contribution of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* IFPL 359 and *Lactobacillus casei* subsp *casei* IFPL 731 to the proteolysis of caprine curd slurries. Journal of food science vol 65, No. 4
 - Pfeifer A and Rosat J-P (1999). Probiotics in Alimentation: Clinical Evidence for their enhancement of the Natural Immunity of the Gut. En Hanson, L y Yolken R H, Ed. Probiotics, other nutritional factors, and intestinal microflora. Nestlé Nutrition Workshop Series, Vol 42, Lippincott-Raven, Philadelphia: 243-257
 - Poolman B., Kunji E., Hagting A., Juillard V., and Konings W. (1995). The proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement, 79, 65S- 75S.
 - Reid G. (2000). Probiotic therapy and functional foods for prevention of urinary tract infections. State of the Art Science Infect Disease Dec 2(6) 518 – 522
 - Reuter G. (1997). Present and future of probiotics in Germany and in Central Europe. Bioscience Microflora 16: 43-51
 - Reynolds E. (1987). The prevention of sub- surface demineralization of bovine enamel and change in plaque composition by casein in an intra oral model. Journal Dental Research 66: 1120-1127.
 - Rokka T., Syväoja E and Tuominen J. (1997), Release of bioactive by enzymatic proteolysis of *Lactobacillus* GG fermented UHT milk, Milchwiissenschaft 52 (12)
 - Rowland I. (2002). Live cultures and cancer prevention. Yoghurt & fermented milks: benefits of live cultures International symposium. Paris, 25 september 2002

-
- Ryhänen E., Pihlanto A., and Pakkala E. (2001), A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *International Dairy Journal* 11 441-447
 - Salminen S., Roberfroid M., Ramos P. Y., and Fonden R. (1998). Prebiotic substrates and lactic acid bacteria. En: *Lactic Acid Bacteria 2nd Edition* (Salminen S. y von Wright A., eds.) Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 343-358.
 - Steijns J., Milk ingredients as nutraceuticals (2001), *International Journal of dairy technology* Vol 54, No. 3.
 - Schaafsma G., (2002) The Concept and definition of probiotics. *Yoghurt & fermented milks: benefits of live cultures International symposium.*
 - Shah N. (2000), Symposium: Probiotic bacteria. *Journal Dairy Science* 83: 894-907
 - Shihata A., and Shah N.P. (2000). Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 10, 401-408.
 - Singh J.,and Sharma K. (1983). Proteolytic breakdown of casein and its fraction by lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft* 38:148.
 - Smacchi E. And Gobbetti M. (2000), Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction whit proteolytic enzymes. *Food Microbiology* 17, 129-141
 - Smid E., Poolman B., and Konings W. (1991). Casein utilization by Lactococci. *Applied and environmental microbiology* Sept p 2447-2452.
 - Strom, M.B., Rekdal, O. and Svendsen, J.S. (2000), Antibacterial activity of 15 residue lactoferricin derivatives. *Journal Peptide Research.* 56, 265-274
 - Swaisgood H., and Clare D.A. (2000) Bioactive milk peptides: a prospectus *Journal Dairy Science.* 83: 1187-1195
 - Syndifrais. (2002). *Yoghurts and fermented milk* Letter n° 6 p1
 - Tamime A., and Robinson R. (1991). *Bioquímica de la fermentación en: Yogur* Ciencia y Tecnología Edit. Acribia. Pp 268- 276
 - Tjwantan B., Poolman B., and Konings W. (1993). Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Research* 60: 269-286.
 - Torrez, M.R (1997). Efecto antimicrobiano de las bacterias utilizadas como probióticos humanos. 1er. Simposio mexicano de probióticos
 - Torrez, M.R. (2000). Microbiología de las bacterias con características probióticas. 2º. Simposio mexicano de probióticos
 - Torrez, M.R. (2003). Estudio de bacterias probióticas. 3er Simposio mexicano de probióticos
 - VanNiel C, Feudtner C, Garrison M and Christakis D. (2002) *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: A meta-analysis. *Pediatrics*; 109(4): 678-84
 - Vinderola C., and Reinheimer J. (2000), Enumeration of *Lactobacillus casei* in presence of *L. acidophilus*, *bifidobacteria* and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal* 10, 271-275

-
- Zourari A., Accolas J.P., and Desmazeaud M.J. (1992). Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. *Lait* 72, 1-34