



Utilización del sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* para la generación de péptidos potencialmente bioactivos.

T E S I S

Que para obtener el grado de
Maestro en Biotecnología

P R E S E N T A

I. A. Claudia Yuritzí Figueroa Hernández

DIRECTOR:

Dra. Lorena del Carmen Gómez Ruiz

ASESORES:

Dra. Judith Jiménez Guzmán

Dra. Carmen Wachter Rodarte

Diciembre de 2007

Utilización del sistema proteolítico de Lactococcus lactis para la generación de péptidos potencialmente bioactivos

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el No. de Registro 0471-O”

Iztapalapa, D. F., a 19 de diciembre de 2007

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

Utilización del sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* para la generación de péptidos potencialmente bioactivos.

Que presentó

I.A. Claudia Yuritzí Figueroa Hernández

Director:

Dra. Lorena del Carmen Gómez Ruiz

Jurado:

Dra . Edith Ponce Alquicira (Presidente)

Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano (Secretario)

Dra. Judith Jiménez Guzmán (Vocal)

Dra. Carmen Wachter Rodarte (Vocal)

*“Que la comida sea tu alimento y el alimento tu medicina”
Hipócrates*

Agradecimientos

A mi directora, la **M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz** a quien agradezco todo el tiempo, comprensión y consejos brindados en la realización de este trabajo además de su gran calidez humana. Finalmente todo este esfuerzo valió la pena. Muchísimas gracias por todo.

A la **Dra. Judith Jiménez Guzmán** Te agradezco tu infinita disposición, tus consejos y sugerencias durante la realización de este trabajo. Gracias también por tu amistad.

A la **Dra. Carmen Wachter Rodarte** por todos los comentarios, tiempo y comprensión para la realización de este proyecto.

A la **Dra. Edith Ponce Alquicira** y la **Dra. Gabriela Rodríguez Serrano** cuyos consejos enriquecieron a este proyecto. Muchísimas gracias por sus sugerencias.

A la **Dra. Alma Cruz Guerrero** y al **Dr. Mariano García Garibay** por los consejos y el tiempo brindado. Fue un honor trabajar con ustedes.

Finalmente le quiero agradecer a dos personas que me ayudaron muchísimo en la realización de este proyecto:

Angie, quien me ayudo me enseñó algunas técnicas como la electroforesis además de que me brindo su amistad. Mil gracias.

Ivonne: quien me brindo su amistad, sus consejos y su tiempo, no tengo palabras para agradecerte todo lo haz hecho por mí. Gracias por tu invaluable amistad.

Dedicatorias

Este trabajo esta dedicado a la memoria mi abuelo **Guillermo**, quien me inspiró con su ejemplo a luchar por los ideales. Gracias por todos los momentos y enseñanzas que nos brindaste. Te quiero mucho.

A mi familia: sin su apoyo este trabajo no hubiera sido posible, son lo que impulsa a seguir adelante. Los quiero mucho.

A mi directora de tesis M en C. Lorena Gómez Ruiz: por todo el apoyo y consejos brindados durante la realización de este trabajo. Es una gran persona.

A mis amigos:

Ivonne: Eres como una hermana para mi. Gracias por enriquecerme como persona, eres una persona excepcional.

Miriam: Por todos los consejos brindados, tú también eres como una hermana. Hemos pasado por muchas cosas en la vida (buenas y malas) pero siempre hemos mantenido esta hermosa amistad.

Francisco y Edvard: Por su gran confianza y afecto que me han demostrado en el transcurso de los años, gracias por su amistad.

Omar: Por todos los momentos y experiencias que han enriquecido nuestra amistad. Te quiero mucho.

Ofelia y Alejandra: por todos los momentos vividos desde la carrera, gracias por su amistad y por aguantarme en las etapas difíciles que hemos tenido. Gracias por todo.

Índice

Resumen	12-13
1. Introducción	14-15
2. Antecedentes	16-61
2.1 Composición de la leche	16-28
2.1.1. La leche como alimento funcional	16-28
2.1.2. Proteínas de la leche	18-21
2.1.2.1. Caseínas	19-21
2.1.2.1.1. α_{s1} -Caseína (α_{s1} -CN)	20
2.1.2.1.2. α_{s2} -Caseína (α_{s2} -CN)	20-21
2.1.2.1.3. β -Caseína (β -CN)	21
2.1.2.1.4. κ -Caseína (κ -CN)	21
2.1.2.2. Proteínas del suero lácteo	22-28
2.1.2.2.1. Generalidades	22
2.1.2.2.2. Bioactividad de las proteínas del suero	22-23
2.1.2.2.3. β -Lactoglobulina (β -LG)	23-24
2.1.2.2.4. α -Lactoalbúmina (α -LA)	25
2.1.2.2.5. Lactoferrina (Lf)	25-26
2.1.2.2.6. Seroalbúmina (SA)	26-27
2.1.2.2.7. Inmunoglobulinas (Ig)	27
2.1.2.2.8. Glicomacropéptido (GMP)	27-28
2.1.2.2.9. Otras fracciones minoritarias	28
2.1.3. Péptidos bioactivos en la leche	29-46
2.1.3.1. Péptidos antimicrobianos	31-32
2.1.3.2. Péptidos antitrombóticos	32-33
2.1.3.3. Péptidos inmunomoduladores	33-35
2.1.3.4. Caseinofosfopéptidos (CPP)	35-36
2.1.3.5. Péptidos opioides	36-38
2.1.3.6. Péptidos antihipertensivos	38-39
2.1.3.7. Péptidos con otras actividades biológicas	40-41
2.1.3.8. Utilización de los péptidos bioactivos	41-44
2.1.3.9. Medios de producción de los péptidos bioactivos	44-45
2.1.3.10. Presencia de péptidos bioactivos en productos lácteos fermentados	45-46
2.2. Bacterias Lácticas	47-61
2.2.1. Generalidades	47
2.2.1.2. Sistema Proteolítico de las Bacterias Lácticas	48-49
2.2.2. Propiedades probióticas de algunas BAL	49-53
2.2.2.1. Generalidades	49-51
2.2.2.2. Efectos en la salud	51-53
2.2.3. Género <i>Lactococcus</i>	53-61
2.2.3.1. Generalidades	53-54
2.2.3.2. <i>Lactococcus lactis</i>	54-61

Utilización del sistema proteolítico de Lactococcus lactis para la generación de péptidos potencialmente bioactivos

2.2.3.2.1. Generalidades	54-56
2.2.3.2.2. Sistema proteolítico de Lactococcus lactis	56-61
2.2.3.2.2.1. Proteinasas	56-57
2.2.3.2.2.2. Sistemas de Transporte	57-58
2.2.3.2.2.3. Peptidasas	59-61
3. Objetivos	62
3.1. General	62
3.2. Particulares	62
4. Hipótesis	62
5. Metodología	63-69
5.1. Plan de trabajo	63
5.2. Cepa utilizada	63-64
5.2.1. Acondicionamiento de la cepa	64
5.3. Preparación de las leches para la fermentación	64-65
5.4. Fermentación	65
5.5. Almacenamiento	65
5.6. Determinación de grupos aminos libres por el método de Ácido Trinitrobencensulfónico (TNBS)	65-66
5.7. Electroforesis en gel de PoliacrilamidaSDS (SDS-PAGE)	67-69
6. Resultados y discusión	70-91
6.1.1. Generación de grupos amino libres durante la fermentación	70-74
6.1.2. Determinación de los grupos amino libres durante el almacenamiento en refrigeración	74-76
6.2. Determinación de péptidos por electroforesis SDS-PAGE	76-91
6.2.1. Determinación de los péptidos generados en las fermentaciones realizadas con el 10% de sólidos de leche	76-79
6.2.2. Determinación de los péptidos generados en las fermentaciones realizadas con el 15% de sólidos de leche	79-82
6.2.3. Determinación de los péptidos generados en las fermentaciones realizadas con el 20% de sólidos de leche	82-86
6.2.4. Comparación de los PM de los péptidos generados durante las fermentaciones con los PM de péptidos reportados como bioactivos	86-91
7. Conclusiones	92-93
7.1. Recomendaciones	93
8. Perspectivas	94-95
9. Bibliografía	96-101
10. Apéndices	102-105
10.1. Abreviaturas y símbolos de los aminoácidos	102
10.2. Preparación de soluciones	102-104
10.2.1. Soluciones para el método de TNBS	102-103
10.2. Soluciones para electroforesis	103-104
10.3. Estándares utilizados para la electroforesis	104-105
10.3.1. Estándar de amplio rango	104

10.3.2. Estándar de polipéptidos	105
10.4. Curvas patrón	105
10.4.1. Curva patrón del método de TNBS	105
10.4.2. Curva para la determinación de pesos moleculares por electroforesis	105

Índice de Tablas

<i>Tabla 1. Componentes bioactivos de la leche de vaca</i>	17
<i>Tabla 2. Concentración y funciones biológicas de las proteínas Principales de la leche de vaca</i>	19
<i>Tabla 3. Efectos Hipotensivos de las leches fermentadas Evolus y Ameal-S en ratas espontáneamente hipertensas</i>	43
<i>Tabla 4. Algunos péptidos bioactivos que se encuentran en alimentos lácteos</i>	46
<i>Tabla 5. Rendimiento de la concentración de péptidos con respecto a la cantidad de proteína disponible para cada una de las fermentaciones</i>	77
<i>Tabla 6. Concentración total de los péptidos menores a 14.4 kDa generados por Lactococcus lactis durante la fermentación de una leche con 10% de sólidos</i>	78
<i>Tabla 7. PM de los péptidos generados durante la fermentación de una leche con 10% de sólidos con Lactococcus lactis</i>	79
<i>Tabla 8. Concentración total de los péptidos menores a 14.4 kDa generados por Lactococcus lactis durante la fermentación de una leche con 15% de sólidos</i>	80
<i>Tabla 9. PM de los péptidos generados durante la fermentación de una leche con 15% de sólidos con Lactococcus lactis</i>	81
<i>Tabla 10. Concentración total de los péptidos menores a 14.4 kDa generados por Lactococcus lactis durante la fermentación de una leche con 20% de sólidos</i>	83
<i>Tabla 11. PM de los péptidos generados durante la fermentación de una leche con 20% de sólidos con Lactococcus lactis</i>	84
<i>Tabla 12. Péptidos potencialmente bioactivos encontrados por electroforesis generados en las fermentaciones</i>	87-88
<i>Tabla 13. Coincidencias de péptidos reportados como bioactivos en yogures y otros productos lácteos fermentados</i>	90

Índice de figuras

<i>Figura 1. Estructura de la Lactoferricina B</i>	32
<i>Figura 2. Sistema Proteolítico de las BAL</i>	49
<i>Figura 3. Micrografía Electrónica que muestra a Lactococcus lactis adherido a las células de la pared intestinal</i>	56
<i>Figura 4. Sistemas de Transporte de péptidos en Lactococcus lactis</i>	58
<i>Figura 5. Reacción del TNBS con los grupos aminos</i>	66
<i>Figura 6. Separación de los péptidos generados por las fermentaciones realizadas con el 10% de sólidos de leche</i>	77
<i>Figura 7. Separación de los péptidos generados por las fermentaciones realizadas con el 15% de sólidos de leche</i>	80
<i>Figura 8. Separación de los péptidos generados por las fermentaciones realizadas con el 13% de sólidos de leche</i>	83

Índice de gráficos

<i>Gráfico 1. Concentración de los grupos amino libres y comportamiento del pH durante las fermentaciones</i>	71
<i>Gráfico 2. Concentración de los grupos amino libres durante las fermentaciones</i>	72
<i>Gráfico 3. Concentración de grupos amino libres durante el almacenamiento</i>	75
<i>Gráfico 4. Perfiles de péptidos menores a 7 kDa en las fermentaciones con Lactococcus lactis en un medio con 10% de sólidos de leche</i>	79
<i>Gráfico 5. Perfiles de péptidos menores a 7 kDa en las fermentaciones con Lactococcus lactis en un medio con 15% de sólidos de leche</i>	82
<i>Gráfico 6. Perfiles de péptidos menores a 7 kDa en las fermentaciones con Lactococcus lactis en un medio con 20% de sólidos de leche</i>	85

Abreviaturas

ACE: Enzima convertidora de angiotensina
 α_{s1} -CN: α_{s1} -Caseína
 α_{s2} -CN: α_{s2} -Caseína
 α -LA: α - Lactoalbúmina
BAL: Bacterias ácido lácticas
 β -CN: β -Caseína
 β -LG: β - Lactoglobulina
CLA: Ácido linoleico conjugado
CPP: Caseinoforfo péptidos
Da: Daltons
Dpp: Sistema de transporte para di y tripéptidos hidrofóbicos
DtpT: Sistema de transporte para di y tripéptidos hidrofílicos
FOSHU: Food for Special Health Uses
GMP: Glicomacropéptido
HPLC: Cromatografía de líquidos de alta afinidad
?-CN: ?-Caseína
Ig: Inmunoglobulina
Lf: Lactoferrina
?-CN: ?-Caseína
MR S: Medio de cultivo Mann Rogosa Sharpe
NNP: Nitrógeno no proteico
Opp: Sistema de transporte de oligopéptidos
PAGE: Gel de poliacrilamida
Pep: Peptidasas
PM: Peso Molecular
SA: Seroalbúmina
SDS: Dodecil sulfato de sodio
TCA: Ácido tricloacético
TNBS: -Ácido Trinitrobencensulfónico
UFC: Unidades formadoras de colonias

Resumen

En las últimas dos décadas se ha intensificado la investigación en el campo de los componentes bioactivos que se encuentran en los alimentos, uno de estos componentes son los péptidos bioactivos. Estos péptidos bioactivos se encuentran encriptados en la estructura de las proteínas alimentarias y una de las fuentes principales son las proteínas de la leche. Se sabe que la leche es un alimento con una alta densidad nutricional y además es una fuente importante de compuestos con actividades biológicas (carbohidratos, lípidos y proteínas) que van más allá del aspecto nutricional. En varios estudios se ha demostrado la capacidad de varias cepas de bacterias lácticas (BAL) de liberar secuencias peptídicas bioactivas a partir de su proteína precursora durante el proceso de fermentación. El objetivo de este trabajo fue determinar si el sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* presenta la capacidad de generar secuencias potencialmente bioactivas a partir de las proteínas de la leche.

En este estudio se determinó la cantidad de grupos amino libres para medir el grado de hidrólisis de las proteínas de la leche, la cantidad de grupos amino libres fue medida por el método del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS). Se probaron tres diferentes concentraciones de sólidos de leche para determinar en cual de estos medios se puede producir una mayor cantidad de péptidos. Se observó que las tres concentraciones de sólidos probadas presentaron tendencias similares, aumentando desde el tiempo 0 hasta llegar a su máximo entre las 28 y 32 horas. De acuerdo a los experimentos realizados se observó que la concentración de sólidos tuvo un efecto en la concentración de grupos amino libres obteniéndose una mayor concentración en las fermentaciones realizadas con el 20% de sólidos.

Durante el tiempo de almacenamiento se observó una disminución en la concentración de grupos amino libres y aunque posteriormente se observó un incremento en ningún caso se alcanzan los niveles de acumulación obtenidos durante las fermentaciones.

La cantidad de péptidos fue determinada por electroforesis en gel de poliacrilamida modificada con una T=20% y una C=6%). El análisis de las imágenes de los geles de electroforesis se efectuó mediante el analizador de imágenes Gel-Doc. Se encontró que los geles realizados con las muestras de las fermentaciones de 20% de sólidos presentaron una menor cantidad de péptidos menores a 14 kDa que los de las fermentaciones con 10 y 15 %

de sólidos. El peso molecular de los péptidos generados durante las fermentaciones osciló entre 13.7 a 0.37 kDa. El peso molecular de algunos de estos péptidos coincidió con el peso molecular de péptidos reportados como bioactivos, encontrándose que la mayoría de los péptidos encontrados en las fermentaciones coinciden con péptidos antihipertensivos, acarreadores de minerales e inmunomoduladores.

Se encontró que el PM de algunos de los péptidos generados en las fermentaciones coincidió con el peso molecular de péptidos encontrados en yogures comerciales (Lala, Alpura, Danone, Yoplait, Nestlé) los cuales son fermentados con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* y en la leche fermentada LC1 la cual es fermentada con *Lactobacillus johnsonii* y *Streptococcus thermophilus*. Esta coincidencia nos indica cierta similitud en la especificidad entre los diferentes sistemas proteolíticos de estas bacterias lácticas.

1. Introducción

Debido a que hoy en día, el consumidor pone mucha atención en la relación que existe entre buena alimentación y salud, los productores, los investigadores y los profesionales en el área de alimentos han centrado su interés en los “nutraceúticos y los alimentos funcionales”, los cuales contienen algún o algunos componentes bioactivos (Leroy & Vuyst, 2004).

Se sabe que la fracción protéica de la leche contiene muchos componentes valiosos y sustancias que tienen alguna actividad biológica (Meisel, 1998). Dentro de los más relevantes están los péptidos bioactivos. Según Korhonen y Pihlanto (2003 b y c) las proteínas de la leche son la fuente más importante de este tipo de péptidos. Los péptidos generados por la hidrólisis de las proteínas de la leche tienen diversos efectos en el organismo (en los sistemas nervioso, inmunológico, cardiovascular y endócrino) dependiendo de la secuencia de aminoácidos que lo conformen.

Durante la última década se ha demostrado que algunas bacterias lácticas (*Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus GG* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) (Hartmann & Meisel, 2007; Korhonen & Pihlanto, 2003; Smacchi & Gobbetti, 2002) tienen la capacidad de generar péptidos durante la fermentación de la leche, ya que poseen un sistema que les permite degradar las proteínas de la leche (principalmente las caseínas) a aminoácidos y péptidos (Juillard *et al.*, 1998).

En este trabajo se pretende generar péptidos potencialmente bioactivos a partir de la actividad del sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* cuando es crecido en leche.

Se probaron diferentes medios para la generación de péptidos en los cuales varió la concentración de sólidos de leche (10, 15 y 20%) para determinar en cual de estos medios se producía una mayor concentración de fragmentos peptídicos potencialmente bioactivos. La cantidad de péptidos durante las fermentaciones se cuantificó como el aumento en la concentración de grupos amino libres en cada uno de los puntos analizados. La concentración de grupos amino libres se determinó por el método del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS). También se midió la concentración de grupos amino libres durante el almacenamiento a 4°C durante 15 días.

Se estimaron los pesos moleculares y la concentración de los péptidos menores a 14.4 kDa mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Posteriormente se realizó una

Utilización del sistema proteolítico de Lactococcus lactis para la generación de péptidos potencialmente bioactivos

comparación de los pesos moleculares de los péptidos generados con los pesos moleculares de los péptidos reportados como bioactivos.

2. Antecedentes

2.1. Composición de la leche

La leche ha sido reconocida como parte fundamental de la dieta humana desde tiempos inmemoriales. Se sabe que la leche es una secreción polifásica producida por la glándula mamaria, que contiene aproximadamente 5% de lactosa, 3.2 de proteínas, 4% de lípidos y 0.7% de sales minerales. El valor nutricional de la leche y de los productos lácteos se debe en gran parte a estos componentes. Además de estos compuestos la leche presenta en su composición sustancias que brindan protección inmunológica y otras que presentan alguna actividad fisiológica en bs neonatos y en los adultos (Sindayikengera & Wenshui, 2005).

La leche se encuentra en un estado en equilibrio en el cual se pueden diferenciar tres fases principales: emulsión (la cual consiste en la capa de glóbulos grasos que forma la crema), suspensión (caseínas y sales minerales que forman el cuajo) y solución (suero con proteínas y sustancias solubles). En la leche también se distingue un estado micelar, el cual consiste en la agregación de aproximadamente el 80% de las proteínas totales con hasta un 8% de minerales (principalmente fosfato de calcio). Las micelas de la leche contienen cantidades significativas, a nivel fisiológico, de calcio y fósforo, lo que constituye aproximadamente un 27% del calcio total de la leche (Cheftel *et al.*, 1989). El contenido de calcio presente en la micela determina el diámetro de ésta, el cual oscila de 0.02 a 0.6 μm . La función de la micela es prevenir la calcificación de la glándula mamaria (Silva & Malcata, 2005).

2.1.1. La leche como alimento funcional

Desde hace cientos de años la leche era usada para prevenir infecciones, por esta razón en un texto antiguo de origen islámico, se le reconocía su valor mediante la cita: “*Bebe leche porque quita rápidamente el calor del corazón, fortalece la espalda, incrementa al cerebro, aumenta la inteligencia*”. Aunque estas palabras no están fundamentadas por los estándares científicos de nuestros días, demuestran que aún en esos tiempos el consumo de la leche traía grandes beneficios en la salud a quien la consumía. Ya en el siglo XX, gracias

al desarrollo de la nutrición, se estudiaron y reconocieron el valor y la cantidad de nutrientes que se encontraban en la leche. Desde ese momento y principalmente en los últimos 30 años se ha investigado y demostrado que la leche y los productos lácteos pueden ayudar a prevenir o reducir cierto tipo de desórdenes crónicos como la osteoporosis, hipertensión, obesidad y sobrepeso, cáncer de colon entre otros. Se sabe que la prevención de estos desórdenes se debe en gran parte a que la leche y los productos lácteos contienen entre otras cosas componentes que presentan algún tipo de actividad en el organismo (bioactividad).

Tabla 1 Componentes bioactivos de la leche de vaca

Componentes bioactivos
Proteínas del suero
Péptidos derivados de la caseína
Péptidos derivados del suero
Calcio biodisponible
Oligosacáridos
Acido linoleico conjugado (CLA)
Enzimas

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

Aunque las diferentes fracciones de la caseína (α_{s1} -, α_{s2} -, β -, κ -), pueden llegar a representar alrededor del 80% de las proteínas totales, no tienen establecido ningún papel fisiológico, se ha demostrado que los péptidos derivados de éstas presentan algunas propiedades biológicas en el organismo. Estos péptidos con actividad biológica se encuentran encriptados en estado inactivo dentro de las secuencias polipeptídicas de estas proteínas (Shah, 2000).

Las proteínas del suero de la leche constituyen el 20% del total de las proteínas de la leche y algunas de éstas poseen propiedades fisiológicas, como las proteínas ligadoras de metales, las inmunoglobulinas, los factores de crecimiento y hormonas. En estudios realizados con animales de laboratorio (ratas y ratones) se ha demostrado que algunas proteínas del suero tienen propiedades inmunoestimuladoras y anticancerígenas en animales de laboratorio (McIntosh *et al.*, 1995; Wong & Watson, 1995).

Se ha reportado que la lactosa promueve la absorción del calcio, además de que es un precursor de la lactulosa y otros galacto-oligosacáridos, los cuales promueven el crecimiento de las bacterias probióticas. Algunos oligosacáridos presentes en la leche inhiben el crecimiento de *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus pneumoniae* y *E. coli* enteropatógeno (Shah, 2000).

Se piensa que el calcio juega un papel en la regulación de la presión sanguínea, ya que existe una evidencia epidemiológica de la asociación de ésta con el consumo de cantidades elevadas de calcio proveniente principalmente de productos lácteos. El posible papel protector del calcio en la prevención del cáncer de colon está siendo investigado, en estos estudios se ha propuesto la capacidad que tiene este mineral de ligar las sales biliares, las cuales son las promotoras principales de este tipo de cáncer, y así lograr prevenir su efecto tóxico (Sindayikengera & Wenshui, 2005).

En lo que corresponde a los componentes grasos con actividad biológica podemos destacar el papel del ácido linoleico conjugado (CLA), la esfingomielina, el ácido butírico y el mirístico, los cuales actúan como protectores contra ciertas enfermedades crónicas (algunos tipos de cáncer y arteriosclerosis) (Sindayikengera & Wenshui, 2005; Shah, 2000; Pariza, 1997).

2.1.2. Proteínas de la leche

La leche se considera un buen alimento en gran parte debido a la alta calidad de sus proteínas, las cuales tienen propiedades nutricionales, biológicas y funcionales que las hacen únicas. El contenido proteico medio es de 30-35 g/L, lo cual equivale al 95% del nitrógeno que se haya disponible en la leche. En este fluido biológico pueden distinguirse dos grupos principales de proteínas: las caseínas, las cuales son proteínas fosforadas e insolubles a un valor de pH de 4.6 y las proteínas del suero las cuales se encuentran solubles a este valor de pH (Sindayikengera & Wenshui, 2005). Además de las caseínas y de las proteínas del suero, existen otros dos grupos de proteínas o material ligado a proteína, como es el caso de la proteosa peptona y del nitrógeno no proteico (NNP). La proteosa peptona se precipita al agregarse ácido tricloroacético (TCA) al 12%, mientras que el NNP es soluble en esta solución (Fox & McSweeney, 1998).

Las sustancias nitrogenadas no proteínicas (NNP) constituyen una pequeña parte que comprende un gran número de sustancias con un peso molecular inferior a los de las proteínas (500 Da). Son sustancias dializables, y permanecen en solución en las condiciones en que se produce la precipitación de las proteínas; su estructura química es muy variada. Junto con los aminoácidos libres se encuentran: urea, creatina, nucleótidos, etc (Alais, 1991).

En la tabla 2 se enlistan las principales proteínas que se encuentran en la leche de vaca así como la concentración y sus funciones sugeridas o establecidas.

Tabla 2 Concentración y funciones biológicas de las proteínas principales de la leche de vaca (Sindayikengera & Wenshui, 2005)

Proteína	Concentración (g/L)	Funciones biológicas sugeridas
Caseínas (α -, β -, γ -)	28	Precursoras de péptidos bioactivos
?-Lactoglobulina	3.3	Acarreador de retinol, liga ácidos grasos, precursor de péptidos bioactivos
?-Lactoalbúmina	1.2	Síntesis de lactosa, acarreador de Ca^{2+} , precursor de péptidos bioactivos
Inmunoglobulinas	0.5- 0.1	Protección inmunespecífica
IgG1	0.6	Sistemas de anticuerpos
IgG2	0.06	
IgM	0.09	
IgA	0.08	
Glicomacropéptido	1.2	Agente antimicrobiano, antitrombótico y regulador de la función gástrica
Lactoferrina	0.1	Acción antimicrobiana, transportador de Hierro y precursor de péptidos bioactivos
Lactoperoxidasa	0.03	Antimicrobiana con efecto sinérgico con las IG's y la Lactoferrina
Lisozima	0.0004	Acción antimicrobiana
Seroalbúmina	0.3	Precursor de péptidos bioactivos, liga ácidos grasos
Proteosa peptona	1.2	Acarreador potencial de minerales

2.1.2.1. Caseínas

Las caseínas representan aproximadamente el 80% del total de las proteínas de la leche de vaca y se encuentran básicamente en forma de complejos macromoleculares, estos complejos contienen minerales (principalmente fosfato de calcio) cuya concentración llega a representar hasta el 8% de su composición. A estos complejos se les conoce como micelas. Existen cuatro fracciones principales la α_{s1} (38%), la α_{s2} (10%), la β (36%) y la γ -caseínas

(13%). El peso molecular de cada una de las fracciones antes mencionadas va desde 20 a 25 kDa. Presentan una baja solubilidad a un pH de 4.6.

Las caseínas comparten una estructura similar, son proteínas conjugadas, la mayoría con grupos fosfatos, los cuales se encuentran esterificados a sus residuos de serina, estos grupos fosfatos son importantes para la formación de la micela de caseína. La unión del calcio a cada una de las caseínas individuales es proporcional al contenido de fosfato. Las fosforilaciones son modificaciones post-traduccionales y solo se lleva a cabo la fosforilación en algunas serinas específicas, las cuales se encuentran definidas por una secuencia de reconocimiento (S-X-A, en el cual la X es un aminoácido cualquiera y A aminoácido cuyo grupo R sea de naturaleza ácida).

La conformación de las caseínas se parece mucho a las proteínas globulares desnaturalizadas. Tiene un gran número de residuos de prolina lo cual causa un torcimiento en la estructura y esto inhibe la formación de estructuras secundarias altamente ordenadas. Las caseínas tampoco contienen enlaces disulfuro, por lo que son muy estables a altas temperaturas y sus residuos hidrofóbicos presentan una considerable exposición (Cheftel *et al.*, 1989).

2.1.2.1.1. α_{s1} -Caseína (α_{s1} -CN)

Es la caseína que se encuentra en mayor proporción, se conocen cinco variantes genéticas: A, B, C, D y E. Su secuencia está compuesta por 199 aminoácidos, de los cuales 19 son prolinas. Tiene un peso molecular de 23,000 Da, consiste en 199 residuos de los cuales 19 son de prolina. Consta de dos regiones hidrófobas, que contienen todos los residuos de prolina; que están separados por una región polar, la cual contiene uno de los ocho grupos fosfatos. Posee estructuras poco ordenadas, ya que no presenta una gran cantidad de α -hélices, presenta estructura secundaria abierta, lo que permite el libre acceso a las proteasas. Esta fracción puede ser precipitada con bajas concentraciones de calcio.

2.1.2.1.2. α_{s2} -Caseína (α_{s2} -CN)

Se conocen cuatro variantes genéticas: A, B, C y D que tienen la misma estructura primaria, sólo se diferencian en el grado de fosforilación. Tiene un peso molecular de 25,000 Da, consiste de 207 residuos de los cuales 10 son residuos de prolina. Es la más hidrófila de todas las caseínas debido a que contiene más grupos fosfoseril (10 a 13) y además tiene

una gran cantidad de residuos catiónicos. Los grupos fosfoseril están agrupados en tres dominios (residuos: 8-16, 56-61, 129-133) mientras que la parte hidrófoba se limita a las porciones 160-207 correspondiente al C-terminal y a la secuencia 90-120. Esta estructura sugiere que las interacciones electrostáticas son muy importantes y dependen del valor de pH (Cheftel *et al.*, 1989).

2.1.2.1.3. β -Caseína (β -CN)

Posee siete variantes genéticas: A1, A2, A3, B, C, D y E. Tiene un peso molecular de 24,000 Da y consta de 209 residuos, de los cuales, 35 residuos son prolinas. Es la más hidrófoba de las caseínas; las partes fuertemente cargadas están separadas por un segmento muy largo hidrófobo; así la parte N-terminal (residuos de 1-21) que contiene cuatro de los 5 átomos de fósforo tiene una carga neta de -12 a un pH de 6.6, mientras que la parte hidrófoba no tiene carga a ese mismo valor de pH, La molécula presenta un carácter anfipolar muy marcado ya que tiene una parte muy polar (1/3 de la molécula) y una parte correspondiente al C-terminal muy hidrófoba, (2/3 de la molécula). El alto contenido en prolina confiere a la molécula una estructura poco ordenada.

2.1.2.1.4. κ -Caseína (κ -CN)

Esta fracción es esencial para estabilizar las micelas de la leche y sólo se conocen dos variantes genéticas: A y B. Es una glicoproteína que presenta un peso molecular de 19,000 Da, consta de 169 residuos de los cuales 20 corresponden a prolinas, en su estructura primaria presenta residuos de Cys, aminoácido no presente en las otras fracciones de la caseína. Se divide en dos dominios claramente diferenciados, el segmento N-terminal hidrofóbico y con la carga neta positiva y el extremo C-terminal, de alto carácter hidrofílico. Es muy resistente a la precipitación del calcio. Estabiliza a las otras caseínas, al darse el rompimiento con quimosina en los enlaces Phe₁₀₅ y Met₁₀₆ se elimina su capacidad estabilizadora dando como resultado dos porciones: una hidrofóbica (para- κ - caseína) y otra hidrofílica llamada caseinomacropéptido (Cheftel *et al.*, 1989).

2.1.2.2. Proteínas del suero lácteo

2.1.2.2.1. Generalidades

El suero representa una rica y variada mezcla de proteínas que poseen un amplio rango de propiedades fisicoquímicas y funcionales. Concretamente las proteínas del suero suponen alrededor del 20% de las proteínas totales de la leche de vaca. Las proteínas principales del suero en la leche de vaca son: la β -Lactoglobulina (50%), la α -Lactoalbúmina (20%), la Seroalbúmina (10%) y las Inmunoglobulinas (10%). Son proteínas globulares típicas, que no se encuentran fosforiladas pero algunas son glicosiladas, son insensibles al Ca^{2+} y en contraste con las caseínas la mayoría de éstas poseen estructura terciaria y cuaternaria. Contienen una menor cantidad de ácido glutámico y prolina que las caseínas, pero son ricas en aminoácidos azufrados (Cys, Met) y ramificados (Leu, Val, Ile) (Walzem *et al.*, 2002; Fox, 2001; Cheftel *et al.*, 1989). Las proteínas del suero al ser digeridas permanecen solubles al pH ácido del estómago (lo cual contrasta con las caseínas las cuales forman coágulos), esto provoca que su paso por el estómago sea muy rápido y que lleguen al intestino prácticamente intactas permitiendo que su absorción sea a través de un sector más largo del intestino. Su largo paso por el intestino facilita una gran variedad de funciones, por ejemplo, interacciones con la flora intestinal o con los minerales presentes en el bolo alimenticio lo cual aumenta su absorción (Jiménez & García, 2006).

2.1.2.2.2. Bioactividad de las proteínas del suero

Las proteínas del suero no sólo juegan un papel importante en la nutrición al ser una fuente balanceada de aminoácidos, sino que además, en muchos casos, pueden ejercer determinados efectos biológicos y fisiológicos, *in vivo* esto ha quedado demostrado en una gran cantidad de investigaciones realizadas desde la década de los noventa. Entre estas proteínas bioactivas del suero de leche se pueden mencionar a la α -lactoalbúmina, la β -lactoglobulina, la lactoferrina, la lactoperoxidasa, las inmunoglobulinas, el glicomacropéptido y una gran variedad de factores de crecimiento, las cuales están implicadas en un gran número de efectos fisiológicos que han sido observados en animales y humanos. Pero lo más relevante es que estas mismas proteínas parcialmente hidrolizadas pueden producir

numerosos péptidos que poseen actividades biológicas (Jiménez & García, 2006; Walzem *et al.*, 2002; Fox & McSweeney, 1998).

Se ha demostrado que algunas proteínas del suero como la lactoferrina (Lf) y la β -lactoglobulina (β -LA) presentan actividades antimicrobianas y antivirales capaces de inhibir patógenos a nivel gastrointestinal, de promover la respuesta inmune del organismo, o bien de regular el desarrollo celular (Meisel, 1997).

Wong y Watson en 1995 reportaron que las proteínas del suero parecían incrementar la respuesta inmune, tanto la humoral como la celular. Esta posible acción parece estar relacionada con el aumento de la concentración de glutatión mediada por las proteínas del suero, esto se debe a que estas proteínas tienen una gran cantidad de sustratos necesarios para la síntesis del glutatión (aminoácidos azufrados). La presencia de altas cantidades de glutatión en los tejidos tumorosos detiene el desarrollo del tumor, posiblemente por la disminución de los radicales libres y por la reducción del daño en el DNA inducido por la oxidación. Además de que se sabe que el glutatión es necesario para la actividad y proliferación linfocitaria, particularmente de las células T (Korhonen & Pihlanto, 2003 c).

En el suero también existen factores estimuladores de crecimiento dentro de los cuales podemos incluir a la lactoferrina, al factor de crecimiento de epidermis (EGF), al factor de crecimiento transformado (TGF) y al factor de crecimiento tipo insulina (IGF). Las propiedades de estimulación de crecimiento de estas proteínas han sido muy estudiadas y se han propuesto diferentes mecanismos mediante el cual llevan a cabo esta acción: 1) Ayudan a mejorar la absorción de nutrientes esenciales, como el calcio y otros minerales; 2) transporte controlado de aminoácidos esenciales a tejidos particulares; 3) estimulación directa del crecimiento celulares; y 4) inhibición de citoquinas que promueven la destrucción de tejidos e indirectamente disminuyen el crecimiento (Shah, 2000).

2.1.2.2.3. β - Lactoglobulina (β -LG)

Es la proteína que se encuentra en una mayor proporción en el suero de la leche (representa alrededor del 60% del total de las proteínas del suero de leche de vaca). Se han realizado un gran número de estudios sobre las propiedades fisicoquímicas de la β - LG. Se conocen siete variantes genéticas: A, B, C, D, E, F y G (Fox, 1992). Se trata de una proteína globular compacta de estructura desordenada con distribución uniforme de residuos no polares, polares e ionizados. Su secuencia consiste en una cadena de 162 aminoácidos con

un peso molecular aproximado de 18 kDa, esta proteína es rica en aminoácidos azufrados ya que contiene dos moles de cistina (Cys₆₆₋₁₆₀ y Cys₁₀₆₋₁₁₉) y una de cisteína (Cys₁₂₁) por cada monómero de 18 kDa. La cisteína juega un papel muy importante ya que los puentes disulfuro que se forman por el efecto del calentamiento con la γ -CN, dan estabilidad a las micelas de caseínas durante el calentamiento e interfieren con el proceso de coagulación enzimática. (Fox & McSweeney, 1998).

La estructura secundaria de esta proteína incluye una estructura en forma de α -hélice en un 15%, la cual se estabiliza por la formación de enlaces hidrofóbicos entre los residuos no polares y las Lys. También presenta una estructura de lámina β en un 50 % y una forma desordenada en un 15 -20% (Creamer *et al.*, 1983).

En cuanto a su estructura cuaternarias se ha encontrado que la β -LG se encuentra en forma de dímero (unión no covalente de dos monómeros) a un valor de pH entre 5 y 7 (**Pérez & Calvo, 1995**). Si el valor de pH es inferior a 3.5 o superior a 7.5 se lleva a cabo la disociación de los monómeros, debido a repulsiones electrostáticas entre sus unidades, mientras que a valores de pH entre 3.5 y 5.2 la β -LG se encuentra en forma de tetrámeros y octámeros (Wong *et al.*, 1996).

La ausencia de fosfato así como el bajo contenido de prolina y la presencia de cisteína, cistina y metionina hacen que la β -LG sea poco estable frente a agentes desnaturizantes, como el calor, los álcalis, los compuestos orgánicos y los metales pesados. Además la desnaturalización de esta proteína, provoca la exposición de grupos activos, ocultos en la estructura nativa, que pueden reaccionar entre si o con otros grupos de otros compuestos (Chaplin & Lyster, 1986).

Se sabe que la β -LG fija minerales, ya que posee regiones con una gran cantidad de aminoácidos cargados, los cuales permiten fijarlos y acarrearlos durante su paso a través de la pared intestinal. Además del acarreo de minerales, la β -LG posee un dominio ligeramente hidrofóbico, por lo que facilita la absorción de vitaminas liposolubles como el retinol (aunado al hecho de que la estructura globular de esta proteína le confiere estabilidad contra los ácidos y enzimas proteolíticas que se encuentran en el estómago) (Jiménez & García, 2006; Fox & McSweeney, 1998; Papiz *et al.*, 1986). Además, por su alto contenido de aminoácidos azufrados favorece la síntesis de glutatión lo cual tiene un efecto positivo sobre el sistema inmunológico (Jiménez & García, 2006).

2.1.2.2.4. *a*- Lactoalbúmina (*a*- LA)

La *a*-Lactoalbúmina (*a*-LA) es un componente original de la leche que se sintetiza por la glándula mamaria, pero es dos veces menos abundante (en la leche de vaca) que la β -LG. Esta constituida por 123 aminoácidos y cuatro enlaces disulfuro. Presenta tres variantes genéticas A, B y C, siendo la variante B la más común. Esta proteína se caracteriza por su bajo peso molecular 14.4 kDa y su elevado contenido de residuos de triptofano (alrededor del 7.2%). Su estructura ha sido determinada parcialmente por medio de la cristalografía (Alais, 1991).

La estructura primaria de la *a*- LA es homóloga a la lisozima de muchas especies, como la del huevo de pollo. De un total de 123 residuos en *a*- LA, 54 son idénticos a residuos de lisozima y 23 son estructuralmente similares. La *a*- LA es una metalo-proteína, liga el Ca^{2+} en un espacio que contiene cuatro residuos de aspartato. Estos residuos son altamente conservados en la *a*- LA y en la lisozima. Esta es la proteína del suero más termoestable. Cuando el pH se reduce hasta 5, los residuos de aspartato empiezan a protonarse y pierden su habilidad de ligar calcio (Fox & McSweeney, 1998).

Debido a su alto contenido de aminoácidos ramificados se utiliza para disminuir el daño al tejido muscular provocado por el ejercicio o la anoxia. Algunos estudios sugieren además que esta proteína podría tener aplicaciones en la prevención del cáncer, pues puede inducir la apoptosis celular (muerte celular programada), función que se pierde en las células tumorales (Jiménez & García, 2006).

2.1.2.2.5. Lactoferrina (Lf)

La lactoferrina (Lf) es una glicoproteína, está formada por 689 aminoácidos teniendo un peso molecular próximo a los 80 kDa, es producida por las células epiteliales de las mucosas de los mamíferos. Pertenece a la familia de las proteínas transportadoras de hierro, también denominadas como transferrinas. Esta proteína presenta una alta homología entre especies localizándose en secreciones mucosas como lágrimas, saliva, fluidos vaginales y seminales. Sin embargo se encuentra en una mayor concentración en el calostro y la leche (7 g/L en el calostro humano).

La molécula de Lf se encuentra integrada por una cadena polipeptídica simple, la cual se encuentra plegada en dos lóbulos globulares simétricos (lóbulos N y C) que se interconectan por una región bisagra. Cada lóbulo tiene la capacidad de unir un átomo de

Fe^{2+} o Fe^{3+} , aunque también pueden unirse iones Cu^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} . Esta glicoproteína presenta una carga neta positiva con un punto isoeléctrico entre 8 y 8.5. (Lønnerdal & Iyer, 1995).

La habilidad de la lactoferrina de inhibir el crecimiento microbiano en condiciones *in vitro* fue una de las primeras funciones descritas para esta proteína, y esto puede ser debido al secuestro del hierro del medio, el cual es requerido para el metabolismo microbiano. Sin embargo en los últimos años se ha descrito un segundo mecanismo antibacteriano, el cual es independiente del hierro y que implica a la región básica cercana al N-terminal de esta proteína. Este mecanismo fue clarificado por estudios que muestran que la lactoferrina puede romper o incluso penetrar la membrana celular de las bacterias (Yamauchi *et al.*, 1993) además de que se han aislado los péptidos correspondientes a la región N-terminal llamados lactoferrinas, los cuales han mostrado ser más potentes que la misma lactoferrina (Bellamy *et al.*, 1992).

Se ha demostrado también que la lactoferrina puede favorecer la respuesta inmune del organismo ya que promueve la proliferación de linfocitos y la diferenciación celular, lo cual ayuda a la reparación de los tejidos dañados (Walzem *et al.*, 2002). Varios estudios han demostrado que puede ayudar al tratamiento de algunos tipos de cáncer, y se han llegado a proponer varios mecanismos por los cuales podría ejercer su actividad. Algunos de los mecanismos más simples por los que esta proteína podría prevenir el desarrollo de tumores, provienen de su capacidad antioxidante, pues esta proteína podría actuar como apagador de radicales libres, que promueven la formación de tumores. Se ha demostrado que el efecto bactericida de esta proteína contra *Helicobacter pylori*, podría ayudar a prevenir el cáncer de estómago, ya que ésta bacteria ha sido asociada con el éste tipo de cáncer (Jiménez & García, 2006).

2.1.2.2.6. Seroalbúmina (SA)

La seroalbúmina consiste en una cadena de 582 aminoácidos, de peso molecular aproximado de 66.2 kDa. En su estructura contiene 17 puentes disulfuro y un grupo tiol libre. La seroalbúmina se ha encontrado como monómero o dímero, pero no se han encontrado polimerizaciones de mayor grado. Schlimme y Buchneim en el 2002 encontraron que la estructura globular de la seroalbúmina se estabiliza gracias a la presencia de una cisteína con un grupo -SH libre en la posición 34 y de 17 puentes disulfuro.

Es una proteína con una baja estabilidad térmica, por lo que se desnaturaliza fácilmente. Presenta tendencia a unirse a otras moléculas principalmente a ácidos grasos, lo que le sirve de protección frente al ataque enzimático y a la desnaturalización térmica.

2.1.2.2.7. Inmunoglobulinas (Ig)

Existen cinco clases de inmunoglobulinas (Ig G, Ig M, Ig A, Ig D e Ig E), de las cuales la Ig G es la que se encuentra en mayor concentración, representando alrededor del 80 % de las inmunoglobulinas presentes en la leche. Su actividad como anticuerpo favorece las transferencias de inmunidad pasiva al neonato. Todas las inmunoglobulinas presentan una estructura similar, la cual está compuesta por cuatro subunidades de peso molecular próximo a los 160 kDa unidas a su vez por puentes disulfuro.

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas altamente heterogéneas que pueden encontrarse de forma monomérica (alrededor de un 80-90% de la fracción total de Ig) o polimérica, las cuales pueden distinguirse por su especificidad inmunoquímica.

Una unidad monomérica está conformada por cuatro cadenas polipeptídicas (dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras), las cuales se encuentran unidas por dos puentes disulfuro. Las cadenas pesadas (cadenas H) tienen un peso de entre 50 a 70 kDa mientras que las cadenas ligeras (cadenas L) tienen un peso de 20 kDa. La proporción de ambas cadenas es responsable de la unión de los antígenos y las regiones C-terminales determinan las propiedades fisicoquímicas de cada una de ellas (Steijns, 2001).

2.1.2.2.8. Glicomacropéptido (GMP)

Sólo se encuentra en el suero de quesería debido es un polipéptido resultante del rompimiento de la k-caseína bovina tratada con quimosina durante la elaboración de queso. Este rompimiento genera dos péptidos, los residuos del cuajada (f1-105) y el glicomacropéptido (f106-169) (Silva & Malcata, 2005; Schlimme & Buchneim, 2002). Su peso molecular aproximado es de 7000 Da.

Este es un glicofosfopéptido que carece de aminoácidos aromáticos y presenta una gran cantidad de aminoácidos ramificados. Su porción C-terminal es más hidrofílica y contiene oligosacáridos unidos a treonina y serina. Para su correcta absorción necesita ser desdoblado a péptidos menores (Aimutis, 2004).

Posee la habilidad de unir las enterotoxinas de *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*, gracias a sus estructuras glicosídicas. Sus carbohidratos asemejan los sitios receptores de las enterotoxinas. Se ha observado que puede ser utilizado en dietas que controlan a las enfermedades hepáticas en donde los aminoácidos ramificados se aprovechan como fuentes de carbono y como agentes que estimulan la absorción de calcio, hierro o zinc. (Silva & Malcata, 2005).

El glicomacropéptido es un potente estimulador de la hormona pancreática colecistoquinina, la cual es una hormona supresora del apetito que desempeña varias acciones implicadas en las funciones gastrointestinales, como la regulación de la ingesta de alimento, la motilidad del intestino, el vaciado gástrico y la liberación de enzimas pancreáticas (Beucher *et al.*, 1994).

2.1.2.2.9. Otras fracciones minoritarias

La lisozima es una enzima antibacteriana localizada en la leche, las lágrimas y la saliva, siendo su mejor fuente la leche humana (2.5 mg/100ml). El mecanismo de acción de la lisozima se da por la hidrólisis de uniones $\beta(1-4)$ glicosídicas de los peptidoglicanos de la pared celular bacteriana (Alais, 2001).

La lactoperoxidasa es una peroxidasa con porfirina (grupo hemo Fe^{3+}), la cual es secretada por la glándula mamaria. Consiste en 612 aminoácidos los cuales constituyen una sola cadena polipeptídica. El grupo hemo está unido a la cadena polipeptídica por un puente disulfuro. Tiene un peso molecular aproximado de 77,500 Da (Özer, 1999). Esta enzima forma parte de un complejo conocido como sistema lactoperoxidasa en el cual actúa como catalizador de la oxidación del ión tiocianato (SCN^-) a hipotiocianato ($OSCN^-$), gracias al peróxido de hidrógeno producido por las bacterias endógenas (Aimutis, 2004). Este sistema es uno de los sistemas antimicrobianos más estudiados en los últimos 20 años. La oxidación del grupo sulfhidrilo (-SH) de enzimas y proteínas bacterianas debido al ión hipotiocianato ($OSCN^-$) es de vital importancia para el efecto bacteriostático o bactericida de este sistema. Este sistema causa un daño estructural a los microorganismos, permitiendo la salida de los iones potasio, aminoácidos y polipéptidos al medio circundante, lo cual impide la toma de nutrientes del microorganismo (glucosa, pirimidinas, purinas y aminoácidos) inhibiendo la síntesis de proteínas y DNA (Özer, 1999).

2.1.3. Péptidos bioactivos en la leche

Varios estudios que se han llevado a cabo durante las últimas dos décadas han mostrado que las proteínas ya no sólo pueden ser consideradas como componentes nutricionales, ya que ellas también poseen otras propiedades biológicas. En particular se ha encontrado que los hidrolizados de proteínas de leche presentan actividades fisiológicas que pueden influenciar la regulación del sistema inmune, la presión sanguínea, el transporte de minerales o la coagulación. (Rokka, 1997)

Se denominan como péptidos bioactivos a “aquellos péptidos que se producen por una hidrólisis enzimática de proteínas alimenticias y que poseen alguna actividad biológica” (Smacchi & Gobetti, 2000). Este tipo de péptidos fueron aislados por primera vez en 1975, y en 1979 se demostró que los péptidos derivados de una digestión enzimática de la caseína de leche de vaca, tenían una actividad opioide. A partir de entonces han sido detectados una gran cantidad de este tipo de péptidos en diversas fuentes como son la leche humana, la leche de vaca y en algunas proteínas vegetales (Meisel & Schlimme, 1990).

En el año de 1995 Schlimme y Meisel reportaron que a partir de las proteínas lácteas se podían obtener péptidos bioactivos. Estos péptidos que se encuentran encriptados en las proteínas de la leche, usualmente tienen una longitud de 3-20 residuos por molécula (Korhonen & Pihlanto, 2003 a y b), y han mostrado tener una gran variedad de actividades tales como antitrombóticas, inmunomoduladoras, opiáceas y como acarreadores de minerales. La mayoría de estas acciones se pueden ejercer, siempre y cuando los péptidos logren atravesar el epitelio intestinal para entrar a la circulación sanguínea o se logren unir a los sitios receptores específicos de las células intraepiteliales para emitir señales celulares con un impacto fisiológico.

De todas las proteínas presentes en la leche, la caseína parece ser la mejor fuente de este tipo de péptidos, aunque también se han encontrado fragmentos peptídicos con actividad biológica provenientes de las proteínas del suero.

Para que los péptidos bioactivos lleven a cabo su función en el organismo es necesario que estos sean liberados de sus secuencias precursoras. Estos péptidos derivados de las proteínas de la leche son inactivos en el interior de la secuencia de la proteína precursora pero pueden ser liberados mediante una hidrólisis química o enzimática.

La proteólisis enzimática la cual puede llevarse a cabo con el uso de proteinasas y peptidasas de las bacterias ácido lácticas (Juillard *et al.*, 1995) o bien mediante el uso de enzimas digestivas como la pepsina (Meisel, 2001).

Algunos de estos péptidos derivados de la leche revelan tener propiedades múltiples, como algunas secuencias peptídicas que tienen dos o más actividades biológicas diferentes (Meisel & Bockelmann, 1999), por ejemplo, los péptidos de la secuencia 60-70 de la β -CN muestran actividad inmunoestimuladora, opioide e inhibidora de la ACE (antihipertensiva). Lo anterior puede deberse a que existen algunas regiones en la estructura de las caseínas que contienen secuencias peptídicas las cuales ejercen diferentes efectos biológicos. Estas regiones han sido consideradas como “zonas estratégicas”, ya que éstas están protegidas del rompimiento proteolítico, debido a que contienen una gran cantidad de residuos de prolina y presentan una secuencia altamente hidrofóbica (Korhonen & Pihlanto, 2003 a).

Actualmente se sabe que un gran cantidad de este tipo de péptidos tiene un gran potencial como componente de alimentos funcionales, ya que administrados en pequeñas cantidades (nutricionalmente insignificantes), pueden ejercer efectos fisiológicos. Los péptidos digeridos después de la proteólisis intestinal, probablemente no pierden sus propiedades bioactivas después de la absorción, esto puede producir efectos locales sobre la región gastrointestinal después de 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 resulta muy complicado detectarlos dentro del plasma, a través de algún método químico (Meisel & Schlimme, 1990).

Los péptidos bioactivos derivados de la leche se han clasificado, de acuerdo a su actividad específica en el cuerpo humano en:

- Péptidos antimicrobianos
- Péptidos acarreadores de minerales
- Péptidos antitrombóticos
- Péptidos inmunomoduladores
- Péptidos opioides
- Péptidos antihipertensivos (inhibidores de ACE)

2.1.3.1. Péptidos antimicrobianos

Es bien conocido que el efecto antibacteriano total de la leche suele ser mayor que la suma de las contribuciones individuales de las inmunoglobulinas, proteínas de defensa (como la lactoferrina, lactoperoxidasa y lisozima) y de los péptidos producidos por algunas proteínas lácteas. Lo anterior se debe a la actividad sinérgica que ocurre entre todas las fracciones antes mencionadas, especialmente entre las proteínas y los péptidos generados de éstas (Clare & Swaisgood, 2000).

En las últimas dos décadas se han descrito una gran cantidad de péptidos antibacterianos codificados en la estructuras primarias de las proteínas de la leche. Parece ser que el efecto antimicrobiano de los péptidos derivados de las proteínas lácteas parece estar relacionado con la carga neta positiva de éstos. Un gran porcentaje de aminoácidos constituyentes son básicos y entre ellos forman un bucle en forma de α -hélice en el extremo carboxilo terminal (Kang *et al.*, 1996), lo que provoca la formación de canales iónicos en la membrana de los microorganismos (Agawa *et al.*, 1991), alterando su permeabilidad y provocando la muerte celular (Bellamy *et al.*, 1992).

Caseidina. Se obtiene de la digestión de la caseína- α_{s2} (f164-179), con quimosina a un pH neutro, presenta 4 aminoácidos básicos en su estructura, fue el primer péptido identificado con actividad antimicrobiana; actualmente se ha purificado y se ha comprobado su actividad antimicrobiana *in vitro* contra *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* (Silva & Malcata, 2005).

Casocidina-I. Es un péptido catiónico derivado de la caseína- α_{s2} (f165-203), el cual contiene una alta proporción de aminoácidos básicos (10 de 39), impide el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus carnosus* (Meisel, 2001).

Isracidina. Es un segmento N-terminal de la caseína- α_{s1} (f1-23), el cual se obtiene al hidrolizar esta proteína con quimosina. Se ha probado que inhibe el crecimiento *in vitro* de Lactobacilos y otras bacterias gram positivas, pero sólo cuando se encuentra en altas concentraciones (0.1- 1 mg/ml). En estudios con ratones se ha detectado que este péptido los protege contra el ataque de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Este péptido se probó, con resultados positivos, en vacas, para comprobar su eficacia contra la mastitis en niveles comparables con los usados con antibióticos convencionales.

Lactoferricina B. Este péptido es obtenido por la acción de la pepsina durante la digestión proteolítica de la lactoferrina (f17-41). Se ha demostrado que tiene efectos contra las bacterias Gram -positivas (*Bacillus*, *Listeria* y *Streptococcus*) y Gram-negativas (*E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Proteus* y *Pseudomonas*) en estudios *in vitro*. En estudios recientes se ha probado que la lactoferricina B actúa sobre las afecciones enterohemorrágicas causadas por *E. coli* en cantidades significativamente menores que la lactoferrina hidrolizada y que la lactoferrina misma. Se piensa que este efecto puede deberse a la carga neta del péptido, ya que por esta razón se incrementa de forma importante la permeabilidad de la membrana (Meisel, 1998). La estructura de la lactoferricina B se muestra en la figura 1.

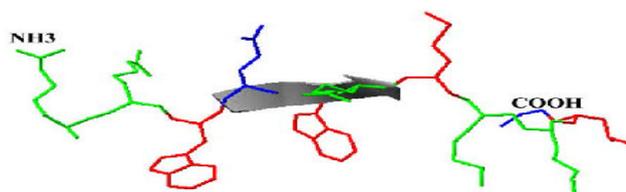


Figura 1. Estructura de la Lactoferricina B

Kappacina Es un péptido que se obtienen de la fracción no glicosilada ni fosforilada del caseinomacropeptido (?-CN f106-169), el cual muestra tener acción inhibitora contra bacterias gram positivas (*Str. mutants*) y gram negativas (*Porphyromonas gingivalis*), además de que ésta fracción peptídica tiene la capacidad de ligar enterotoxinas e inhibir la adhesión de virus y bacterias.

Se ha demostrado la formación de cuatro fragmentos (f15-20, f25-40, f78-83 y f92-100) que presentan actividad antimicrobiana (solamente contra bacterias gram +), los cuales son obtenidos a partir de una digestión proteolítica de la β -LG con tripsina (Gobbetti *et al.*, 2004).

2.1.3.2. Péptidos antitrombóticos

En los últimos años se ha estudiado la similitud existente entre algunas secuencias peptídicas de la ?-CN (principalmente el undecapéptido Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Gln-Asp-Lys correspondiente a la fracción f106-116) y la cadena ? del fibrinógeno. Las fracciones peptídicas derivadas de la ?-CN también conocidas como casoplatelinas actúan

como inhibidores de la agregación plaquetaria y de la unión que se da entre la cadena α del fibrinógeno humano con el receptor específico que se encuentra en la membrana de las plaquetas (Fiat *et al.*, 1993; Meisel, 1997).

Según estudios realizados en 1989 por Fiat y colaboradores, la característica estructural similar entre la cadena α del fibrinógeno y las casoplatelinas, que es responsable de la competencia en el proceso de agregación de las plaquetas, es la homología en la secuencia de aminoácidos Ile₁₀₈, Lys₁₁₂, y Asp₁₁₅.

Se ha encontrado que el fragmento Lys-Arg-Asp-Ser, el cual se obtiene de la lactoferrina presenta actividad antitrombótica, pero presenta otro mecanismo de acción, ya que inhibe, de una forma dosis dependiente, la agregación plaquetaria inducida por ADP, debido a que existe una homología con el fragmento (f 572-575) de la cadena α del fibrinógeno.

En el plasma de recién nacidos alimentados con leche materna o fórmulas infantiles elaboradas a partir de leche de vaca han sido encontradas secuencias peptídicas en una concentración suficiente para ejercer un efecto antitrombótico *in vivo*, esto demuestra su liberación a partir de las proteínas de la leche durante el proceso de digestión gastrointestinal (Chabance *et al.*, 1995). En 1998 Chabance y colaboradores demostraron la presencia de péptidos antitrombóticos en el estómago, duodeno y en la sangre de adultos que habían ingerido leche o yogurt. Este hecho demuestra la capacidad que tienen las bacterias lácticas de hidrolizar las proteínas presentes en la leche para formar péptidos bioactivos durante el proceso de fermentación, así como la capacidad que tiene el tracto gastrointestinal de absorber estos péptidos.

2.1.3.3. Péptidos inmunomodulatorios

El sistema inmune tiene dos funciones primordiales, la primera de ellas es la eliminación de los microorganismos extraños y la segunda es la restauración de los tejidos que se encuentran dañados. Es bien conocido que los humanos poseen dos sistemas de defensa: la inmunidad adquirida o específica, la cual responde a estímulos específicos (antígenos); y la inmunidad innata, la cual no requiere de estímulos, ni requiere de la exposición repetida a éstos, sino que consiste en barreras físicas como membranas mucosa, macrófagos, células especializadas, etc. (Fiat *et al.*, 1993).

La inmunoestimulación fue la primera propiedad biológica demostrada en las proteínas de la leche humana (Fiat *et al.*, 1993). Se sabe que la lactoferrina humana participa en la diferenciación de los linfocitos *in vitro*. El sitio de unión de la lactoferrina con los linfocitos se encuentra en el péptido f (4-52) del extremo N-terminal, el cual es liberado por la tripsina (Gill *et al.*, 2000). La lactoferrina es específica contra las bacterias enteropatógenas y puede actuar en sinergismo con anticuerpos específicos para una mayor protección contra bacterias patógenas (Schanbacher *et al.*, 1998).

Es bien conocido que el sistema gastrointestinal contiene elementos especializados que reaccionan con los antígenos provenientes de la dieta, provocando una respuesta inmunológica. Es así como la mucosa intestinal es la primera barrera de protección contra los patógenos que provienen de los alimentos. La respuesta humoral es el mecanismo principal de protección y previene la entrada de antígenos potencialmente dañinos mientras interactúa con los patógenos que puedan encontrarse en la mucosa (LeBlanc *et al.*, 2002).

Los péptidos que ejercen esta actividad son fragmentos derivados principalmente de la α_1 -CN, de la β -CN, de la γ -CN y de la α -La. Este tipo de péptidos estimulan la actividad fagocítica en los fagocitos (Schlimme & Meisel, 1995) y también modulan las funciones de los linfocitos (Migliore-Samour *et al.*, 1989; Kayser & Meisel, 1996; Schanbacher *et al.*, 1997).

El mecanismo de acción de estos péptidos no está bien establecido, aunque la hipótesis más aceptada describe la unión a los receptores opiáceos situados en la membrana de los linfocitos, lo cual influye en su capacidad inmunoreactiva. Existe una marcada relación entre el sistema inmune y los péptidos opioides, debido a que los receptores opioides μ están presentes en los linfocitos T y en los leucocitos fagocíticos humanos (Meisel & Schlimme, 1990; Meisel, 1998). Se ha identificado que el aminoácido Arg de los extremos amino o carboxilo terminal puede ser reconocido por los receptores específicos de la membrana de los linfocitos y macrófagos (Pagelow & Werner, 1986). Se ha observado que otro grupo involucrado con la estimulación del sistema inmune son los péptidos inhibidores de ACE, ya que estos estimulan la bradiquinina, la cual es inactivada por la ACE, pero que en forma activa estimula macrófagos y la migración de linfocitos (Fiat *et al.*, 1993). La β -casoquinina-10 es uno de los péptidos inhibidores de ACE que también funciona como inmunomodulador.

Fiat y colaboradores en el año 1993 encontraron que péptidos derivados de la hidrólisis de la α y β -CN eran capaces de estimular la fagocitosis de eritrocitos por la acción de macrófagos del peritoneo, así como también ejercer un efecto frente a las infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* tras su administración intravenosa en ratones.

En estudios más recientes se ha descrito que la inmunoreactividad de los linfocitos humanos es estimulada por varios péptidos bioactivos obtenidos a partir de proteínas de la leche. Los péptidos Tyr-Gly y Tyr-Gly-Gly correspondientes a fragmentos de la α -LA y β -CN, respectivamente, incrementaban significativamente la proliferación de linfocitos.

2.1.3.4. Caseinofosfopéptidos (CPP)

En las últimas dos décadas se han realizado muchos estudios acerca de este tipo de péptidos, los cuales pueden funcionar como acarreadores para diversos minerales, especialmente el calcio. En estos estudios se ha propuesto que los caseinopéptidos (o péptidos acarreadores de minerales) pueden formar complejos solubles con el fosfato de calcio *in vitro*, por lo que pueden llevar a un aumento en la absorción del calcio ya que limitan la precipitación de este mineral en el íleon distal (Meisel, 1997).

Se ha reportado que la fosforilación post-traducciona de las caseínas se lleva a cabo en la glándula mamaria durante la biosíntesis de la leche, en la cual la especificidad de la caseína quinasa, es tal que la fosforilación clásicamente ocurre alrededor de secuencias primarias ricas en residuos de serina y ácido glutámico, lo cual conlleva a la formación de los llamados tripletes iónicos (SerP-SerP-SerP-Glu-Glu). Estas secuencias o secuencias muy relacionadas con éstas, se dan en los fragmentos (66- 70) de la α_{s1} -caseína, los fragmentos (8-12, 56-60, 129-133) de la α_{s2} - caseína y en el fragmento (15-19) de la β - caseína (Meisel & FitzGerald, 2003, Korhonen & Pihlanto, 2003 c).

La alta concentración de cargas negativas en los CPP los hace resistentes a una proteólisis posterior, además de que las cadenas laterales con carga negativa, en particular las de los grupos fosfatos son las responsables de la unión de los minerales. Los caseinofosfopéptidos han mostrado capacidad de ligar macroelementos como el calcio, el magnesio y el hierro, pero también tiene la capacidad de ligar oligoelementos como el zinc, bario, cromo, níquel, cobalto y selenio (Silva & Malcata, 2005). En un estudio realizado por

Schlimme y Meisel en 1995 se observó secuencias próximas a los grupos fosforilados determinan las diferencias en la actividad quelante del calcio de los distintos CPP.

En varios estudios realizados en animales y humanos se ha registrado la presencia de caseinofosfopéptidos después de una ingestión de leche, productos lácteos fermentados, caseína u otras preparaciones que contienen este tipo de péptidos (Naito *et al.*, 1972). En estudios más recientes se ha reportado por primera vez la presencia de los CPP en el intestino delgado distal (íleon) de los humanos después de que estos consumieron leche o preparaciones con estos péptidos (Meisel *et al.*, 2001; Hartmann & Meisel, 2007). Estos estudios demostraron que los caseinofosfopéptidos se encuentran de forma natural después de la ingestión de alimentos que contienen caseína y que alguna cantidad de péptidos pueden sobrevivir hasta el íleon distal, esto puede deberse a algunos efectos protectivos que se encuentran en la leche que previenen de una degradación excesiva de estos péptidos cuando estos son ingeridos como parte de sus estructuras intactas (caseínas).

Debido a que los caseinofosfopéptidos pueden ligar y solubilizar minerales, tienen usos potenciales como ingredientes de alimentos funcionales o en suplementos de minerales como el calcio, magnesio, y hierro, ya que estos minerales son requeridos para tener un buen funcionamiento y una ingesta adecuada de estos previene enfermedades como la osteoporosis, la hipertensión y la anemia (Meisel & FitzGerald, 2003)

2.1.3.5. Péptidos opioides

Se ha encontrado que en los sistemas nervioso, inmune y endócrino así como en el tracto gastrointestinal existen una serie de receptores opioides, los cuales pueden ser de tres tipos (μ , δ , κ), estos receptores interactúan con péptidos opioides, los cuales pueden ser exógenos o endógenos (Meisel 1997). Los efectos fisiológicos que pueden ejercer estos péptidos dependen del tipo de receptor al que se una: los receptores μ están vinculados al control de la motilidad intestinal y del comportamiento emocional, los receptores δ al control del comportamiento emocional y finalmente los del tipo κ están relacionados con la analgesia y la saciedad (Korhonen & Pihlanto, 2003 c). Estos péptidos opioides pueden ser clasificados según el tipo de acción que ejercen en los receptores mencionados anteriormente encontrándose a: i) agonistas los cuales actúan principalmente como activadores del receptor μ , ii) Agonistas-Antagonistas los cuales bloquean (antagonistas) a los receptores μ y

actúan como agonistas en los receptores μ , iii) Antagonistas los cuales ejercen la acción contraria a los agonistas, bloqueando a los receptores.

Los péptidos opioides de origen alimentario con actividad opioide fueron descubiertos a finales de la década de los 70s. La característica estructural común entre los péptidos opioides exógenos y endógenos es la presencia de Tyr en el extremo amino terminal (exceptuando a los derivados de la α -CN). La carga negativa que se encuentra localizada en el grupo fenólico de la Tyr ha sido descrita como indispensable para la actividad opiácea, ya que la eliminación de este aminoácido provoca la pérdida de actividad del péptido. La presencia de otro aminoácido aromático, como la Phe o Tyr en la tercera o cuarta posición favorece la fijación del péptido al receptor opioide. Además la prolina en la segunda posición es crucial para la actividad biológica ya que ayuda a mantener la adecuada orientación de las cadenas de los aminoácidos Tyr y Phe (Meisel, 1997; 1998; Meisel & FitzGerald, 2000).

En la leche han sido encontrados péptidos opioides agonistas derivados de las caseínas, conocidos como casomorfina, dentro de las cuales se incluyen fragmentos de la β -CN (f(60-70)) los cuales son ligandos de los receptores μ . Las β -casomorfina son capaces de reducir la secreción gástrica y la motilidad intestinal, por lo que existe gran interés en este tipo de péptidos ya que se pueden emplear en el tratamiento de la diarrea. También se han encontrado péptidos opioides agonistas derivados de otras proteínas como las exorfina, que se encuentran en la secuencia f(90-96) de la α ₁-CN, la α -lactorfina que se encuentra en la fragmento f(50-53) de la α -LA y la β -lactorfina la cual se halla en el fragmento f(102-115) de la β -LG (Meisel & FitzGerald, 2003).

También han sido encontrados en la leche péptidos opioides que suprimen la actividad agonista de las encefalinas, produciendo el mismo efecto que la naloxona, (péptidos antagonistas opioides). Este grupo de péptidos incluye a las casoxina, las cuales se obtienen de la β - y α ₁-CN, y a las lactoferroxina derivados de la lactoferrina. Las casoxina son ligandos específicos para los receptores opioides μ con baja actividad si son comparadas con la naloxona y las lactoferroxina. Estos péptidos antagonistas se consideran péptidos opioides atípicos y presentan como mínimo dos residuos de tirosina (Tyr), su estructura se puede expresar de forma general como: X_a -Tyr- X_b -Tyr-(OCH₃), donde X_a es un residuo neutro o básico y X_b son de 2 a 4 residuos neutros (Meisel & FitzGerald, 2000). La actividad antagonista de estos péptidos se reduce cuando el grupo α -carboxilo se

encuentra libre, en cambio aumenta con la adición de Ser o Pro a derivados de la α -CN (Clare & Swaisgood, 2000).

2.1.3.6. Péptidos antihipertensivos (inhibidores de la ACE)

La hipertensión arterial es un proceso en el cual intervienen una gran variedad de factores, por lo que los péptidos que ejercen una actividad antihipertensiva pueden actuar de forma muy diversa, siendo la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) el mecanismo de acción más estudiado.

Se ha demostrado que la inhibición de la ACE provoca un descenso en la presión arterial en hombres y animales. Existen varios péptidos endógenos que actúan como inhibidores y sustratos competitivos de esta enzima, como las encefalinas, las bradiquininas y la sustancia P.

Los primeros inhibidores de la ACE de origen exógeno que fueron estudiados fueron los aislados del extracto de veneno de la serpiente *Bothrops jararaca*, los cuales mostraron tener un doble efecto, ya que aumentaron la actividad de la bradiquinina y además inhibieron a la ACE en condiciones *in vivo* e *in vitro*. Actualmente el fármaco más empleado para el control de la hipertensión es el Captopril, el cual tiene una elevadísima potencia inhibidora con un valor de IC_{50} de $0.006 \mu M$

Han sido encontrados péptidos con actividad inhibidora de la ACE en hidrolizados de músculo de sardina, bonito y atún, y en aislados de proteínas vegetales como la zeína, pero los péptidos inhibidores de la ACE más estudiados son los que se derivan de las proteínas lácteas, principalmente de las caseínas (de origen bovino y humano), pero también han sido encontrados en hidrolizados de proteínas de suero. Los fragmentos de las caseínas que presentan un efecto antihipertensivo se denominan como casoquininas y los derivados de las proteínas del suero lactoquininas. Las casoquininas que tienen una elevada potencia inhibidora de la ACE (cuyo valor de IC_{50} es menor a $20 \mu M$) se obtienen de los fragmentos de la α 1-CN f(23-27) y β -CNf(177-183), pero también existen fragmentos con una menor actividad inhibidora como los fragmentos de la β -casomorfina-7. Se ha encontrado un fragmento de la β -LG que además de tener una alta potencia inhibidora de la ACE ($IC_{50} = 42.6 \mu M$), es resistente a una digestión posterior (Meisel, 2001).

La enzima convertidora de angiotensina, también conocida como ACE, es una ectoenzima que se localiza en la superficie de las células vasculares endoteliales del cerebro, corazón pulmones, hígado intestino, páncreas, bazo, músculo esquelético y placenta. (Meisel, 1997). La ACE (EC 3.4.15.1) actúa en el sistema renina- angiotensina hidrolizando la angiotensina I, un decapeptido inactivo, con secuencia Asp-Asn-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu, el cual se produce por la acción de la renina. Su hidrólisis conduce a la liberación de la angiotensina II y del dipéptido terminal Hys-Leu. La angiotensina II es un compuesto de elevada potencia vasoconstrictora, que provoca el incremento de la presión arterial. Además de que estimula la secreción de aldosterona, lo que induce a la retención de sodio y agua y a la excreción del potasio. La acumulación de agua provoca el incremento del volumen extracelular con el consecuente aumento en la presión arterial (Silva & Malcata, 2005; Smacchi & Gobbetti, 2000).

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

La unión de los péptidos a la ACE está influenciada por la secuencia tripeptídica C-terminal de los mismos, la cual puede interaccionar con tres regiones del centro activo de la ACE. Los aminoácidos de carácter hidrofóbico, como Trp, Tyr, Phe o Pro favorecen a que se de la unión en estas zonas. Se sabe que el péptido con secuencia C. terminal Phe-Ala-Pro, el cual es un análogo del inhibidor presente en el extracto del veneno de serpiente, se une muy fácilmente al centro catalítico de la enzima. La carga positiva del grupo guanidino o del grupo ε-amino de la Arg y Lys, respectivamente, contribuyen a la potencia inhibitoria. La presencia de aminoácidos dicarboxílicos en la secuencia peptídica o de Pro como penúltimo aminoácido disminuye o anula la actividad inhibitoria de la ACE. El extremo N terminal influye en la actividad, y así, la presencia de Val o Ile en esta posición incrementa la actividad inhibitoria de la ACE en el péptido (Torres *et al.*, 2005; Meisel, 2001, Meisel, 1998).

2.1.3.7. Péptidos con otras actividades biológicas

Péptidos antioxidantes

En estudios recientes se ha demostrado que pueden ser liberados péptidos con propiedades antioxidantes a partir de la hidrólisis de caseína con enzimas digestivas y BAL proteolíticas en leches fermentadas (Korhonen & Pihlanto, 2003 a). La mayoría de estos péptidos son derivados de la α_2 -CN, los cuales han mostrado tener actividades reductoras de radicales libres e inhibidoras de la peroxidación lipídica (enzimática y no enzimática). La presencia de Leu o Pro en el extremo N-terminal puede aumentar su actividad antioxidante y además puede facilitar su efecto sinérgico con antioxidantes de origen no proteico como el BHT o el BHA.

En el futuro, estos péptidos antioxidantes pueden tener aplicaciones en productos cosméticos, farmacéuticos y alimenticios. Es necesaria una mayor investigación para demostrar si estos péptidos producidos durante la fermentación pueden prevenir daños oxidativos *in vivo*. La presencia de Leu o Pro en el extremo N-terminal puede aumentar su actividad antioxidante y además puede facilitar su efecto sinérgico con antioxidantes de origen no proteico como el BHT o el BHA (Hartmann & Meisel, 2007).

Péptidos citomoduladores

Basados en varios estudios citoquímicos se ha probado que existe suficiente evidencia de una posible acción de los péptidos derivados de la leche como mensajeros específicos, los cuales, pueden disminuir la viabilidad de las células cancerígenas. Se ha encontrado que algunos péptidos extraídos de un extracto liofilizado de queso Gouda inhiben la proliferación de las células de la leucemia, aun en concentraciones tan bajas como 1pmol/L. Este efecto antiproliferativo del extracto del queso Gouda puede ser resultado de la apoptosis inducida por los péptidos (citomoduladores que se encuentran en él), en donde se observa que las células cancerosas son mas reactivas con éstos que las células no cancerosas. El sitio primario para que se lleve a cabo este proceso de apoptosis selectiva de las células malignas, podría ser el tracto intestinal. Los efectos de los péptidos citomoduladores y los péptidos inmunomoduladores en la viabilidad y respuesta inmune de las células podrían ser el mecanismo mediante el cual los péptidos bioactivos pueden ejercer efectos protectivos en el desarrollo de tumores (Meisel, 2005; 2001).

Péptidos Hipocolesterolémicos

Nagaoka y colaboradores en 2001 identificaron un péptido hipocolesterolémico (Ile-Ile-Ala- Glu- Lys) en un hidrolizado triptico de la β -LG. Este péptido suprime la absorción del colesterol por las células CaCo-2 *in vitro*. El mecanismo por el cual logra este efecto sigue sin ser clarificado

2.1.3.8. Utilización de los péptidos bioactivos (Alimentos funcionales)

Como se sabe los “alimentos funcionales” se definen como aquellos alimentos que aportan efectos beneficios sobre una o más funciones fisiológicas, más allá de los efectos nutricionales, y que tienen como objetivo mejorar el estado de salud y bienestar o reducir el riesgo de trastornos en el organismo.

Se sabe que la obtención de alimentos funcionales puede llevarse a cabo por la adición de probióticos, prebióticos, simbióticos o ingredientes funcionales. Los péptidos bioactivos se incluyen en el grupo de ingredientes funcionales de naturaleza proteica, que permiten la obtención de alimentos funcionales. Dentro del grupo de los péptidos bioactivos, aquellos con actividad antihipertensiva han centrado el interés de los científicos y las industrias, debido al incremento de la mortalidad en países industrializados por la hipertensión y / o por sus complicaciones renales, cardíacas o cerebrales. Se han empezado a comercializar algunos alimentos con propiedades antihipertensivas. En Japón se comercializa un producto FOSHU (Food for Special Health Uses), el cual contiene el decapeptido f(23-34) derivado de la α s1- CN. Se ha demostrado la acción preventiva de la hipertensión y de los trastornos del sistema circulatorio (Sugai, 1998).

Se comercializan dos leches fermentadas (Ameal S y Evolus) que contienen a los tripéptidos Val-Ile-Pro e Ile-Pro-Pro, los cuales han mostrado tener actividad inhibidora de la ACE y por lo tanto pueden ejercer un efecto antihipertensivo.

Ameal S

Esta leche fermentada es elaborada con *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae* (Takano, 1998; FitzGerald, & Murray, 2006). Es producida por la compañía

japonesa Calpis. Se ha reportado en varios estudios que este producto fermentado tiene propiedades antihipertensivas en ratas espontáneamente hipertensas y humanos (Tabla 3).

En los estudios que se han realizado en humanos sobre el efecto hipotensivo (tabla 3) que tiene esta bebida fermentada los resultados han sido contradictorios, por un lado, Hata y colaboradores en 1996 reportaron que existía una disminución en la presión sistólica (alrededor de -14 mm de Hg) de pacientes voluntarios con hipertensión media que ingirieron 95 ml del producto durante 8 semanas al ser comparados con un grupo control que sólo ingería leche acidificada, mientras que Mizushima y colaboradores, en 2004 reportaron que no existía diferencia estadísticamente significativa en la presión sanguínea de pacientes en condiciones similares al ingerir 160 g de Ameal-S durante 2 semanas.

Evolus

Es una leche fermentada producida en Finlandia con *Lactobacillus helveticus*. LBK16H (Leporanta, 2001), y se ha demostrado que tiene efectos hipotensivos en ratas y humanos, los cuales pueden observarse en la tabla 3.

Existen dos estudios del efecto hipotensivo que ejerce este producto lácteo en hombres, en estos se reporta una disminución significativa de la presión sistólica (de 6 y 10 mm de Hg) cuando se ingiere 150 ml durante 8 y 21 semanas respectivamente al compararse con un grupo control que consumió una leche fermentada por varias cepas de *Lactococcus* (Seppo, 2003; 2002; FitzGerald & Murray, 2006). Sin embargo en un estudio realizado en el año 2004 no se reporta una disminución estadísticamente significativa de la presión sistólica en pacientes que consumieron 150 mL diarios de Evolus durante 21 días (FitzGerald & Murray, 2006; Tuomilehto *et al.*, 2004).

Ambas leches fermentadas ya se comercializan como alimentos funcionales preventivos de la hipertensión en varios países.

Tabla 3 Efectos Hipotensivos de las leches fermentadas Evolus y Ameal-S
(Fitzgerald & Murray, 2006)

Sujeto de estudio	Organismo	Producto	Dosis	Efecto en la Presión Arterial ?Presión sistólica
Ratas	<i>Lactobacillus helveticus</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ameal-S	5 ml /Kg de peso En una sola dosis oral	-21.8± 4.2 (P<0.05) Después de 6 h
Ratas	<i>Lactobacillus helveticus</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ameal-S	10 ml /Kg de peso En una sola dosis oral	-26.4± 3.1 (P<0.01) Después de 6 h
Ratas	<i>Lactobacillus helveticus</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ameal-S	2.5 % (p/p)	-19.1 (P<0.05) Después de 23 semanas
Ratas	<i>Lactobacillus helveticus</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ameal-S	25 ml/día	-10.0 (P<0.001) Después de 14 semanas
Ratas	<i>Lactobacillus helveticus</i> LBK16H	Evolus	27 ml/día	-21.0 (P<0.001) Después de 14 semanas
Humanos	<i>Lactobacillus helveticus</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ameal-S	95 ml /día 30 pacientes con hipertensión moderada	-14.1± 3.1 (P<0.01) Después de 8 semanas
Humanos	<i>Lactobacillus helveticus</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ameal-S	160ml/día	-5.2± 8.1 (P<0.390) Después de 8 semanas
Humanos	<i>Lactobacillus helveticus</i> LBK16H	Evolus	150 ml/día 17 pacientes con hipertensión moderada	-10.1 (P<0.05) Después de 8 semanas
Humanos	<i>Lactobacillus helveticus</i> LBK16H	Evolus	150 ml/día 39 pacientes con hipertensión moderada	-6.7± 3.0 (P<0.03) Después de 21 semanas
Humanos	<i>Lactobacillus helveticus</i> LBK16H	Evolus	150 ml/día	-2.6±15.9 (P<0.311) Después de 21 semanas

Actualmente son comercializados otros alimentos funcionales con péptidos bioactivos como el Biozate y el Bio Pure GMP, los cuales son producidos por la compañía estadounidense Davisco, el primer producto es un hidrolizado de la β -LG y el segundo contiene al glicomacropeptido. En Japón también se comercializa otra bebida bajo el nombre de Casein DP Peptio Drink, la cual contiene el dodecapéptido derivado de la caseína (Phe-

Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys) al cual se le atribuyen propiedades antihipertensivas.

Además de utilizar los péptidos bioactivos como ingredientes en la elaboración de alimentos funcionales, dichos péptidos pueden formar parte de preparaciones farmacéuticas, aplicadas a la prevención y el tratamiento de distintos trastornos del organismo. Actualmente se comercializan suplementos alimenticios con los péptidos antihipertensivos ya mencionados bajo el nombre de Ameal Peptide S (Calpis) en diferentes países de Europa, el suroeste de Asia y Estados Unidos (Hartmann & Meisel, 2007).

Debido a que los caseinofosfopéptidos promueven la recalcificación del esmalte dental (Meisel & FitzGerald, 2003), estos péptidos han sido utilizados en chicles y pastas dentales bajo el nombre comercial de "ReCal-Dent" (Hartmann & Meisel, 2007).

2.1.3.9. Medios de producción de los péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos pueden ser liberados de su proteína precursora de varias formas, las más comunes son las siguientes (Korhonen & Pihlanto, 2003 a, b y c):

- Por una hidrólisis enzimática con enzimas digestivas y enzimas derivadas de otros microorganismos
- Por medio de la fermentación microbiana
- Combinaciones de los métodos anteriores

Una vez que la estructura de los péptidos es conocida, también es posible sintetizarlos, existen tres maneras para lograrlo: 1) por medio de una síntesis química; 2) utilizando tecnología de DNA recombinante; 3) por medio síntesis enzimática (Korhonen & Pihlanto, 2003 a, Meisel, 2001).

Hidrólisis enzimática:

El rompimiento de las proteínas de la leche y la liberación de los péptidos bioactivos de estas estructuras proteicas normalmente ocurre durante el proceso de la digestión por la acción de la pepsina y las enzimas pancreáticas (tripsina, quimotripsina, carboxi- y amino-peptidasas). Estas enzimas producen fragmentos peptídicos activos en el tracto gastrointestinal de los individuos que consumen leche (Schlimme & Meisel, 1995). Los

efectos fisiológicos de los péptidos bioactivos dependen de la habilidad de éstos de alcanzar intactos los sitios implicados en la absorción a través del epitelio intestinal para posteriormente ser transportados a los órganos periféricos. (Vermeirssen *et al.*, 2004)

Muchos de los péptidos bioactivos conocidos han sido producidos *in vitro* utilizando enzimas gastrointestinales, principalmente pepsina y tripsina. Pero también se han utilizado otras enzimas digestivas, combinaciones de éstas (alcalasa, quimotripsina, pancreatina y termolisina) y enzimas de hongos y bacterias (Korhonen & Pihlanto, 2003 c).

Fermentación microbiana

La fermentación natural o controlada se ha explotado desde hace miles de años para preservar distintos alimentos y mantener o alterar sus propiedades nutritivas y/o sensoriales. Los cultivos iniciadores utilizados en la industria alimentaria son proteolíticos, por esta razón se pueden generar péptidos bioactivos en alimentos que son fermentados con estos cultivos iniciadores proteolíticos. Las principales cepas proteolíticas para la elaboración de productos lácteos fermentados son *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus*.

Se han liberado varios péptidos bioactivos a partir de las fermentaciones con las BAL (antihipertensivos, inmunomoduladores, antioxidativos, etc). La manera mas efectiva y sencilla de incrementar la concentración de péptidos bioactivos en los productos lácteos fermentados es fermentar o co-fermentar con cepas de BAL altamente proteolíticas. La selección de las cepas influye en la cantidad de péptidos bioactivos que son liberados (Gobbetti *et al.*, 2004; Korhonen & Pihlanto, 2004; 2001; Matar *et al.*, 2003).

Además del uso de microorganismos, se han usado enzimas proteolíticas aisladas de las bacterias ácido lácticas (BAL) para producir péptidos bioactivos a partir de las proteínas de la leche.

2.1.3.10. Presencia de péptidos bioactivos en productos lácteos fermentados

En la literatura existe bastante evidencia de que se pueden liberar péptidos bioactivos durante los procesos de elaboración de los productos lácteos. Algunas proteinasas endógenas presentes en la leche como la plasmina o catepsina pueden hidrolizar a las caseínas durante el procesamiento y almacenamiento de la leche (Korhonen & Pihlanto,

2003b; Hurley *et al.*, 2000). También se sabe que esos péptidos pueden ser generados durante la fermentación de la leche por la acción proteolítica de los cultivos iniciadores. Debido a este hecho es posible encontrar péptidos con actividad biológica en productos como los quesos y las leches fermentadas (Korhonen & Pihlanto, 2003 b; 2001; Gobbetti *et al.*, 2002).

Durante la maduración de los quesos son formados una gran variedad de péptidos, varios de éstos han mostrado tener algún tipo de actividad (Tabla 4). Los caseinofosfopéptidos se encuentran de forma natural en los quesos y durante la maduración (proteólisis secundaria) de éstos se generan otra clase de péptidos bioactivos, principalmente con actividad antihipertensiva. Se ha estudiado que la actividad antihipertensiva que presentan los quesos es muy dependiente de la etapa de maduración en la que se encuentre el queso.

Tabla 4 Algunos péptidos bioactivos que se encuentran en alimentos lácteos (Korhonen & Pihlanto, 2003 a; 2003 b)

Alimento	Ejemplos de péptidos identificados	Papel Biofuncional
Queso Cheddar	Fragmentos de α_{s1} - y β -CN	Acarreadores de minerales
Quesos italianos Mozzarella Crescenza Italico Gorgonzola	?-CN f(58-72)	Antihipertensivos
Productos tipo Yogurt	α_{s1} -, β -, y ?-CN	Antihipertensivo
Queso Gouda	α_{s1} -CN f(1-9), β -CN f(60-68)	Antihipertensivo
Queso Festivo Queso Emmental	α_{s1} -CN f(1-9), f (1-7), f(1-6) Fragmentos de α_{s1} - y β -CN	Antihipertensivo Acarreadores de minerales, antimicrobianos y Antihipertensivo
Queso Manchego	Fragmentos de α_{s1} -, α_{s2} y β -CN (de origen ovino)	Antihipertensivo
Leche Agria	β -CN f(74-76), f(84-86), ?-CN f (108-111)	Antihipertensivo
Dahi	Ser-Lys-Val-Tyr-Pro	Antihipertensivo
Queso elaborado con enzimas modificadas	?-CN f(60-66)	Opioide y antihipertensivo

2.2. Bacterias Lácticas

2.2.1. Generalidades

Las bacterias ácido lácticas (BAL) es un grupo relativamente heterogéneo de bacterias Gram +, las cuales pueden ser cocos o bacilos. Son habitantes de diversos nichos ecológicos entre los que destacan: una gran variedad de alimentos, la boca, el tracto gastrointestinal y urogenital de humanos y animales.

Comparten también ciertas características que las definen como grupo, entre las que destacan: 1) Presentan un bajo contenido de G+C (menor al 55%) en su DNA 2) Tienen una alta tolerancia a grandes cantidades de ácido 3) Son organismos que no forman esporas 4) Presentan una gran cantidad de auxotrofias y por lo tanto son nutricionalmente exigentes 5) Son aerotolerantes pero no son microorganismos aeróbicos 6) No son capaces de producir porfirinas 7) Presentan un metabolismo estrictamente fermentativo produciendo ácido láctico como producto principal (Broadbent & Steele, 2005).

Dentro de las bacterias lácticas se incluyen a los géneros: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Jay, 2000). Se sabe que las BAL son utilizadas para la fermentación de una gran variedad de productos alimenticios (Tan *et al.*, 1993). Comúnmente se utilizan como cultivos iniciadores, los cuales convierten los alimentos originales en otro tipo de alimentos (conocidos como alimentos fermentados). Para que estas bacterias puedan crecer en leche requieren tener un sistema proteolítico que les permita degradar la caseína (la cual es la fuente principal de nitrógeno en la leche) (Eddy *et al.*, 1991).

La importancia que tienen este grupo de bacterias en la industria alimentaria se debe a que 1) Producen ácido láctico, lo cual disminuye el pH, y por lo inhibe el crecimiento de algunas bacterias de descomposición en alimentos fermentados 2) Producen enzimas y péptidos 3) Algunas especies muestran tener propiedades probióticas 4) Algunas especies producen bacteriocinas

2.2.1.2. Sistema Proteolítico de las Bacterias Lácticas

En la década de los ochenta, se obtuvo una gran cantidad de información acerca del sistema proteolítico (Pritchard & Coolbear, 1993, Tan *et al.*, 1993, Visser, 1993). Se han purificado y caracterizado bioquímicamente una gran cantidad de peptidasas y proteinasas de varias capas de *Lactococcus* y *Lactobacillus*. La presencia de varias peptidasas principales específicas en estos géneros indica que ambos géneros hacen uso de un sistema proteolítico similar (Sasaki, *et al.*, 1995).

Los componentes estructurales del sistema proteolítico de las BAL pueden ser divididas en tres grandes grupos de acuerdo a su función (Kunji *et al.*, 1996):

- **Proteinasas** son las encargadas del rompimiento inicial de péptidos
- **Peptidasas** degradan los péptidos formados por la acción de las proteinasas
- **Sistemas de transporte** trasladan los péptidos producidos hacia la membrana citoplasmática.

De acuerdo a la especie, se pueden encontrar diferencias entre el sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas (BAL), pero es evidente que estas especies necesitan, medios ricos en proteína como la carne y la leche para su crecimiento. Hay dos características que diferencian a estas bacterias de otras bacterias proteolíticas. En primer lugar, las bacterias ácido lácticas son microorganismos con muchas auxotrofías y por lo tanto su crecimiento siempre depende de la eficiencia de su sistema para la degradación de las proteínas y del transporte de aminoácidos y péptidos pequeños. Y en segundo lugar, las bacterias lácticas tienen sistemas proteolíticos que son altamente específicos y dan como resultado la producción de péptidos únicos. Las bacterias ácido lácticas que inician la fermentación en la leche, un medio rico en lactosa, hidrolizan principalmente a la caseína- α_{s1} y a la β -caseína, por ser las proteínas que se encuentran en mayor concentración (Gasson & de Vos, 1994). En la figura 2 se muestra un esquema del sistema proteolítico de las BAL.

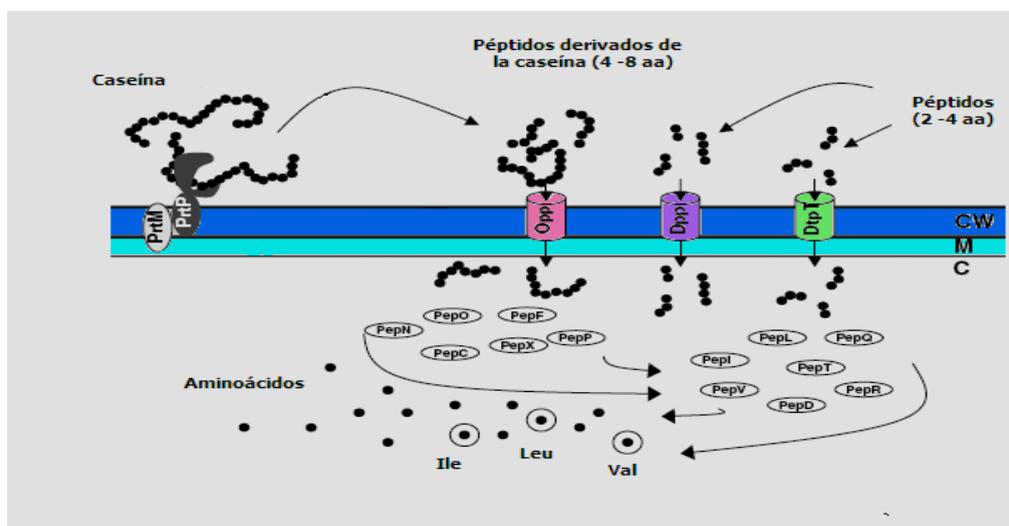


Figura 2 Sistema Proteolítico de las BAL

Es por ello que los sistemas proteolíticos de las bacterias lácticas fermentadoras de la leche que más se han estudiado en las últimas décadas, son los de *Lactococcus* y *Lactobacillus*, principalmente enfocados a la detección, aislamiento y caracterización bioquímica de las enzimas parcialmente purificadas. En estas investigaciones se ha puesto de manifiesto la capacidad proteolítica en varias especies de bacterias lácticas (Gasson & de Vos, 1994).

2.2.2. Propiedades probióticas de algunas BAL

2.2.2.1. Generalidades

El término de probiótico fue utilizado por primera vez, por el ruso Elie Metchnikoff, el cual fue ganador de un premio Nobel. Un probiótico se puede definir como: “un cultivo de microorganismos que pueden ser administrados para disminuir el número de infecciones intestinales o para mejorar la salud en términos generales debido a que puede contribuir a tener un mejor balance gastrointestinal (Fuller, 1989).

Haavenaar y Veld en 1992 en definieron y ampliaron el concepto de probiótico definido por Fuller, quedando como: “microorganismos viables (bacterias lácticas u otras bacterias, o levaduras aplicadas como células secas o en productos fermentados) que ejercen un efecto benéfico en la salud del huésped. Un comité científico definió a los

probióticos como: “microorganismos vivos que al ser consumidos en cierta cantidad pueden ejercer diversos beneficios en la salud además de los inherentes en la alimentación (Guarner & Schaafsma, 1998).

En las últimas dos décadas se han adicionado una gran cantidad de bacterias con propiedades probióticas a una gran cantidad de productos alimentarios, principalmente de origen lácteo (Forestier & De Champ, 2001), estos productos han tenido gran éxito en Japón y Europa.

Existen microorganismos pertenecientes a diferentes géneros que pueden ser utilizados como probióticos, las cepas más utilizadas pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus*)

Algunas características que deben presentar las bacterias probióticas son las siguientes (Shah, 2001):

- **Viabilidad de los organismos probióticos:** para que las bacterias probióticas puedan ejercer beneficios en la salud de quien las consume, deben estar viables y en una concentración elevada, de al menos 10^9 UFC/g de producto. La viabilidad de las bacterias probióticas puede perderse por ciertos factores como la acidez del producto, el ácido que puede producirse durante el almacenamiento, el nivel de oxígeno en los alimentos y la falta de nutrientes requeridos por las bacterias probióticas.
- **Tolerancia al ácido y a la bilis:** Uno de los criterios más importantes para la selección de los microorganismos probióticos, es la habilidad de las bacterias probióticas para sobrevivir en ambientes ácidos como el que se encuentra los productos lácteos y en el estómago, donde el pH puede llegar a 1.5, también los organismos deben de ser capaces de sobrevivir con las concentraciones de sales biliares que se encuentran en el intestino. Se ha podido demostrar que sólo algunas cepas de *L. acidophilus* y *Bifidobacterium spp* logran sobrevivir en las condiciones antes descritas, por lo que no se puede generalizar que todas las cepas probióticas son tolerantes al ácido y a la bilis (Lankaputhra & Shah, 1995).
- **Antagonismo Bacteriano:** Además de la producción de ácido láctico y acético, las cepas probióticas también producen otros ácidos como el cítrico; y otras sustancias

como el peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas, las cuales actúan como sustancias antimicrobianas. Estas sustancias crean un ambiente hostil para las bacterias patógenas y microorganismos de descomposición.

- **Propiedades de adherencia:** La adherencia es uno de los criterios más importantes en la selección de una cepa probiótica. Los efectos deseados del microorganismo probiótico sólo se producen si éste es capaz de adherirse, colonizar y multiplicarse en el intestino. La habilidad del probiótico a adherirse en el intestino aumentará las posibilidades de ocupar un nicho intestinal. La adherencia a la pared celular del intestino es un prerrequisito para la colonización del tracto intestinal (Shah, 2001).

2.2.2.2. Efectos en la salud

En estos días existe suficiente evidencia para validar el hecho de que una administración oral de *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, es suficiente para reparar el balance normal de las poblaciones microbianas en el intestino. También se ha encontrado que además de su papel gastrointestinal, los organismos probióticos ofrecen otros beneficios nutricionales y terapéuticos que a continuación se enlistan (Shah, 2001):

- **Propiedades antimicrobianas:** Las bacterias probióticas producen ácidos orgánicos como el ácido láctico y el acético, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas las cuales son conocidas como sustancias con actividad antimicrobiana. Estas sustancias antimicrobianas disminuyen la multiplicación de las bacterias de descomposición y patógenas, debido a esto las bacterias probióticas han mostrado tener propiedades antimicrobianas contra las bacterias Gram + como el *Staphylococcus aureus* y el *Clostridium perfringens*. El peróxido de hidrógeno en presencia de ácidos orgánicos presenta una mayor actividad antimicrobiana que presentaría si estuviera solo el peróxido de hidrógeno o el ácido láctico.
- **Propiedades antimutagénicas:** Varios estudios han mostrado que existe una relación inversa entre la incidencia de ciertos cánceres y el consumo de productos lácteos fermentados. La actividad antimutagénica de la leche fermentada se ha demostrado *in vitro* contra una gran cantidad de mutágenos como el benzopireno, 2-nitrofluoreno entre otros. El mecanismo de esta actividad todavía no está bien

definido, pero se sugiere que el mecanismo podría ser la ligación de los mutágenos por el microorganismo (Shah, 2001; Sanders, 1999).

- **Propiedades anticarcinogénicas:** Las bacterias ácido lácticas y los productos fermentados derivados de éstas tienen una actividad anticarcinógena. El modo de acción puede ser: por la supresión de enzimas bacterianas, por la activación del sistema inmunológico del huésped, o por la reducción del pH del intestino. Las bacterias probióticas pueden remover las fuentes de sustancias procarcinógenas o las enzimas que conducen a la formación de carcinógenos como las nitrosaminas.
- **Mejoramiento del metabolismo de la lactosa:** La mala absorción de la lactosa, es una condición en la cual la lactosa, el principal carbohidrato de la leche, no es completamente digerido a sus monosacáridos componentes (glucosa y galactosa). Las personas que son mal absorbedoras de la lactosa se quejan de dolores gástricos después del consumo de leche o productos lácteos. La lactosa puede ser digerida por las bacterias probióticas y por lo tanto esta clase de productos puede ser consumidos por personas que presentan este tipo de problemas.
- **Reducción del colesterol en sangre:** Estudios han demostrado que el consumo de ciertos productos lácteos fermentados pueden ayudar a reducir el nivel de colesterol en sangre.

Según un estudio reportado por Homma (1988) en el cual se alimentó a hombres con el colesterol elevado en sangre con alimentos fermentados que contenían una gran cantidad de microorganismos probióticos ($\sim 10^9$ UFC/g), pudieron reducir su nivel de colesterol en sangre de 3.0 g/l a 1.5 g/l. El mecanismo mediante el cual los probióticos bajan el colesterol en sangre no está bien definido (Shah, 2001). Aunque existe una hipótesis en donde se sugiere que ciertas cepas de *Lactobacillus acidophilus* pueden asimilar la molécula de colesterol. También se ha sugerido que algunas cepas de Lactobacilos y Bifidobacterias tienen la capacidad de transformar enzimáticamente las sales biliares, las cuales tienen un papel importante en la regulación del colesterol.

- **Regulación de la presión sanguínea:** Se ha demostrado que algunos productos alimentarios que contienen probióticos pueden contribuir al control de la presión sanguínea. Este efecto antihipertensivo ha sido documentado en estudios con ratas espontáneamente hipertensas (Hata, *et al.*, 1996). Los componentes a los que se le

atribuye principalmente el efecto son dos tripéptidos (Val-Pro-Pro) y (Iso-Pro-Pro) los cuales fueron aislados de un producto conocido como Evolus, que es una leche fermentada con *Sacharomyces cerevisiae* y *Lactobacillus helveticus* (cepas probióticas). Estos péptidos actúan como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina-I y por lo tanto pueden reducir la presión arterial. Es de notar que este efecto se da por un producto y no por las células viables de los probióticos (Sanders, 1999).

- **Estimulación del sistema inmune:** se ha observado que existe una inmunomodulación por *L. acidophilus* y *Bifidobacterium* (Shah, 2001), pero falta estudiar bien el mecanismo mediante el cual se logra este efecto. Se piensa que está asociado con la translocación de un pequeño número de bacterias tomadas de la ingesta al tejido linfático del intestino delgado. (Shah, 2001). La cepa probiótica *Lactobacillus helveticus* tiene la capacidad de liberar péptidos con actividad inmunomoduladora a partir de la (β -, y γ - CN), por lo que algunos efectos de modulación inmunológica de las bacterias probióticas pueden deberse a este tipo de secuencias peptídicas (Hartmann & Meisel, 2007).

2.2.3. Género *Lactococcus*

2.2.3.1. Generalidades

Los miembros del género *Lactococcus* son cocos gram +, que pueden ser ovoides, según las condiciones del medio, generalmente miden de 0.5 a 1.5 μm . No forman esporas y no son móviles. Las especies del género *Lactococcus* crecen en pares o formando pequeñas cadenas. Presentan un metabolismo fermentativo, tienen requerimientos nutricionales complejos y son auxótrofos a una gran cantidad de aminoácidos y vitaminas. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30°C pero pueden crecer a 10° C, pero no a 45° C.

Este género es relativamente nuevo y la mayoría de sus miembros pertenecían a los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus*. El género *Lactococcus* esta comprendido principalmente por cinco especies: *Lactococcus lactis*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus garvieae*. De todas estas especies sólo *Lactococcus lactis* es empleado comercialmente como cultivo iniciador en la industria

quesera principalmente, pero también es utilizado para la fermentación de otros productos lácteos. La composición de estos cultivos iniciadores mesófilos incluyen a las cepas productoras de ácido (*L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*) y a la bacteria fermentadora de ácido cítrico (*L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*) (Batt, 1999).

2.2.3.2. *Lactococcus lactis*

2.2.3.2.1. Generalidades

Las cepas de *Lactococcus lactis* son usadas para la producción de alimentos (quesos, crema agria). No solo contribuyen con el sabor, aroma y textura característicos de estos productos, sino que también ayudan a preservar el producto por la producción de ácidos orgánicos, bacteriocinas y peróxido de hidrogeno.

Los miembros del género *Lactococcus lactis* son bacterias gram positivo, mesófilas anaerobias facultativas. Son bacterias no móviles ni forman esporas. Presentan una morfología esférica o ovoide, los cuales pueden presentarse en pares o formando pequeñas cadenas. Son bacterias homofermentativas que producen principalmente ácido L (+) láctico a partir de la glucosa

Se reconocen dos subespecies (*L. lactis* subsp. *lactis* y *cremoris*). Estas se pueden diferenciar por características fenotípicas. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* puede crecer a 40°C y al 4% de NaCl, produce amoníaco a partir de arginina mientras que *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* no crece a 40°C, ni al 4% de NaCl ni produce amoníaco. Existe una biovariante *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, la cual se distingue por su capacidad de metabolizar citrato.

Los Lactococos son organismos con muchos requerimientos nutricionales, normalmente habitan en medios con fuentes ricas en carbono y nitrógeno, como la leche. Durante las fermentaciones lácticas, el medio de crecimiento para *Lactococcus lactis* es la leche. En el laboratorio es utilizado el medio M-17 para su propagación. Tienen un tiempo de duplicación máximo de 60-70 minutos en la leche y de 35-40 minutos en un medio sintético no definido. Su crecimiento se empieza a inhibir a un pH de 4.5. No necesitan de oxígeno para crecer, pero pueden tolerar la presencia de éste, debido a la presencia de enzimas metabolizadoras de oxígeno.

Las cepas de *Lactococcus lactis* son auxotrofas a una gran cantidad de aminoácidos y vitaminas, los cuales necesitan ser agregados en el medio de crecimiento. Los aminoácidos esenciales para el crecimiento de *L. lactis* son los siguientes: isoleucina, valina, leucina, histidina, metionina, arginina, prolina, glutamato, serina y treonina. Las vitaminas que requieren para tener un crecimiento óptimo son: biotina, piridoxina, ácido fólico, riboflavina, niacina, tiamina y ácido pantoténico. El requerimiento de los aminoácidos y vitaminas depende de la cepa.

Para que *Lactococcus lactis* pueda crecer en la leche requiere hacer uso de su sistema proteolítico, ya que la leche aunque tiene un alto contenido proteico no es una buena fuente de aminoácidos libres, y éstos deben obtenerse a partir de las proteínas presentes en la leche. Una proteólisis adecuada de las proteínas de la leche es esencial para el crecimiento de la cepa y para la producción de ácido durante la fermentación (Courtney, 1999)

Algunas cepas de *Lactococcus lactis* pueden producir bacteriocinas, las bacteriocinas son péptidos o proteínas que pueden inhibir a bacterias muy relacionadas con el género de la bacteria que las produce. Las bacteriocinas producidas por *L. lactis* pertenecen a dos categorías: lantibióticas y no-lantibióticas. La nisina es la bacteriocina mejor caracterizada de todas las bacteriocinas producidas por las BAL y es la única bacteriocina aprobada mundialmente como aditivo alimentario. La nisina inhibe a *Listeria monocytogenes*, *Bacillus*, *Clostridium* y algunas BAL (Barefoot & Nettles, 1993).

Aún cuando no se ha demostrado completamente que *Lactococcus lactis* es una bacteria probiótica, Kimoto y otros autores (1999), han reportado que ciertas cepas de *Lactococcus lactis*, principalmente de las subespecies *lactis* y *cremoris*, tienen la habilidad de resistir en ambientes con valores muy bajos de pH y con concentraciones de sales biliares, además de que presentan una moderada adherencia a las células de la pared intestinal. En la figura 3 se muestra una micrografía electrónica en la que se observa a *Lactococcus lactis* adherido a las células de la pared intestinal.

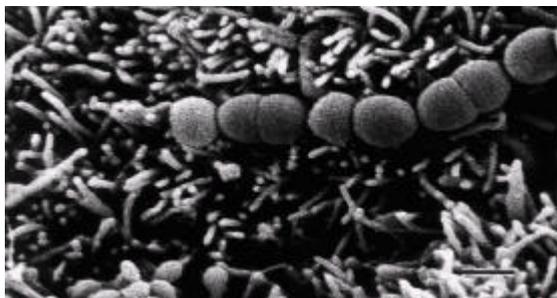


Figura 3 Micrografía Electrónica que muestra a *Lactococcus lactis* adherido a las células de la pared intestinal (Kimoto *et al.*, 1999)

2.2.3.2.2. Sistema proteolítico de Lactococcus lactis

El sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* es el más conocido de todos los sistemas proteolíticos de las bacterias lácticas. Para poder crecer en leche esta bacteria ácido láctica tiene que hacer uso del sistema proteolítico, debido a sus requerimientos nutricionales.

2.2.3.2.2.1. Proteinasas

Las proteinasas realizan el primer paso en la degradación de la caseína, se encuentran ligadas a la pared extracelular y se les designa como PrtP (Kok & De Vos, 1994; Tan *et al.*, 1993; Pritchard & Coolbear, 1993; Smid *et al.*, 1991).

Con base a las pruebas bioquímicas que se le han realizado a las proteinasas de *Lactococcus* se pueden mencionar algunas características importantes (Pritchard & Coolbear, 1993; Tan *et al.*, 1993; Kok, 1990):

- Son proteínas grandes con pesos moleculares de 140 kDa
- Son serinoproteinasas y se ha probado que son inhibidas por los inhibidores típicos de las serinoproteinasas PMSF y DPP.
- Tienen pH óptimo alrededor de 6 (5.5-6.5).
- Exhiben una alta homología con las subtilisinas, las cuales son serinoproteinasas producidas por *Bacillus spp.*

En 1986 Visser y colaboradores propusieron una clasificación de las proteinasas basado en la especificidad del sustrato: 1) Tipo P_I que actúa principalmente sobre la β -CN. Este tipo se encuentra en *Lactococcus cremoris* HP, TR, AC1, C3, W92, H2 y *Lactococcus lactis* NCDO763; 2) Tipo P_{III} que actúa sobre la as1-, β -CN. Este tipo de proteinasa se ha encontrado en *Lactococcus lactis* SK11 y AM1. Ambas proteinasas presentan el 98 % de similitud en su secuencia aminoacídica.

Recientemente se ha demostrado que las proteinasas de tipo P_I, las cuales degradan principalmente la β -CN, pueden formar más de 100 oligopéptidos diferentes, el tamaño de estos péptidos va de 4 a 30 residuos, pero la mayor parte de éstos cae en el rango de 4 a 10 aminoácidos. (Savijoki *et al.*, 2006).

Más del 50% de estos péptidos generados se originan del extremo C-terminal de la β -CN mientras que otro 25% de péptidos son derivados de la región 60-105 de esta misma proteína. También se ha observado que no existe producción significativa de aminoácidos (a excepción de la fenilalanina) ni de di y tripéptidos (Juillard *et al.*, 1995).

2.2.3.2.2. Sistemas de Transporte de Aminoácidos y Péptidos

El segundo paso en la utilización de la caseína es la transportación de los péptidos generados por las proteinasas al interior de las células mediante la acción de diversos sistemas de transporte. Se han descrito varios sistemas de transporte para aminoácidos, para di y tripéptidos y uno de oligopéptidos.

Lactococcus lactis posee al menos 10 sistemas de transporte de aminoácidos, los cuales presentan una alta especificidad para aminoácidos estructuralmente muy similares como Glu/Gln, Leu/Ile/Val, Ser/Thr, Ala/Gly, Lys/Arg/Orn (Kunji *et al.*, 1996; Konings, *et al.*, 1989). Uno de ellos transporta di y tripéptidos hidrofílicos mediante una fuerza motriz de protones (DtpT) y otro sistema (Dpp) transporta di, tri y tetrapéptidos que contienen aminoácidos relativamente hidrofóbicos (aminoácidos ramificados) y es mediado por ATP (Savijoki *et al.*, 2006). El sistema de transporte Dpp ha mostrado ser esencial para el crecimiento de *Lactococcus lactis* en un medio que contiene caseína. Ver figura 4 en donde se muestran los sistemas de transporte de *Lactococcus lactis* (Law & Haandrikman, 1997).

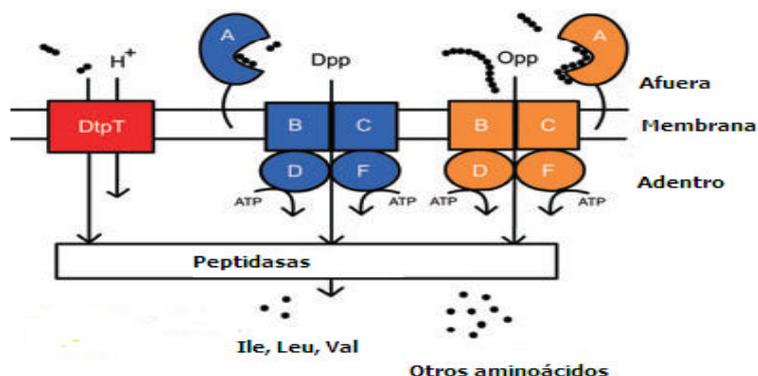


Figura 4 Sistemas de Transporte de péptidos en *Lactococcus lactis*

A partir de estudios realizados con mutantes de *L. lactis* se hizo evidente el hecho de que este microorganismo contaba con un sistema transportador específico para oligopéptidos (Opp), el cual puede transportar péptidos de hasta 10 aminoácidos, se sabe que la naturaleza del péptido afecta la cinética del transporte de los péptidos que van a ser transportados. Al realizarse estudios con inhibidores metabólicos se concluyó que este sistema de transporte está mediado por la hidrólisis de ATP. El sistema Opp pertenece a la superfamilia de proteínas ABC y consiste en cinco subunidades: una de ellas es la que liga al péptido (OppA), dos de ellas están ancladas en la membrana (OppB y OppC) y otras dos ligan el ATP (OppD y OppF) (Doeven *et al.*, 2005; Kunji *et al.*, 1996).

2.2.3.2.3. Peptidasas

Una vez que los péptidos derivados de las caseínas han sido transportados hacia el interior de las células de las bacterias lácticas, éstos son degradados por la acción concertada de peptidasas, las cuales pueden tener especificidades diferentes o traslapadas. Las endopeptidasas intracelulares, las aminopeptidasas generales (PepN y PepC) y la χ propil.dipeptidil aminopeptidasas son las primeras enzimas que actúan sobre los oligopéptidos (Savijoki *et al.*, 2006).

Endopeptidasas

Se han identificado dos endopeptidasas en *L. lactis* subsp. *cremoris*, una de ellas es una metalopeptidasa monomérica (Pep O) de 70 kDa que es capaz de hidrolizar

oligopéptidos pero incapaz de hidrolizar caseína; la otra metalopeptidasa nombrada como (Pep F) tiene la capacidad de hidrolizar péptidos de entre 7 y 17 residuos.

La Pep O tiene la capacidad de hidrolizar pentapéptidos, polipéptidos, como la bradiquinina (9aa), la sustancia P (11 aa), glucagon (29 aa) y la cadena B de la insulina (30 aa) y varios fragmentos de caseína pero no tiene la capacidad de degradar di, tri y tetrapéptidos. Un estudio en su secuencia reveló la presencia de una secuencia consenso (His-Glu-X-X-His), que es típica de las metalopeptidasas dependientes de zinc. Al realizar estudios con los genes de la metalopeptidasa se demostró que el sistema de transporte de oligopéptidos (Opp) y la endopeptidasa (Pep O) se encuentran ligados, con el uso de cepas mutantes se observó que la Pep O no es esencial para la utilización de las caseínas o oligopéptidos lo cual contrasta con el sistema Opp que es esencial para el crecimiento de la bacteria a partir de la caseína. Aparentemente la actividad de la Pep O puede ser reemplazada por otras peptidasas con especificidades de sustrato similares (Law & Haandrikman, 1997).

Aminopeptidasas

Se cree que las aminopeptidasas son de suma importancia para el desarrollo del sabor en los productos lácteos fermentados, debido a que son capaces de liberar aminoácidos libres a partir de los oligopéptidos formados por la actividad de las proteinasas. Las aminopeptidasas pueden ser muy específicas (tal es caso de la aminopeptidasa específica para glutamato) o pueden presentar una amplia especificidad (como las aminopeptidasas generales N y C).

- **Aminopeptidasas generales**

La aminopeptidasa general N (Pep N) es una metalopeptidasa de alrededor de 95 kDa, la cual es capaz de hidrolizar el aminoácido terminal del extremo N de una gran variedad de péptidos, los cuales difieren en tamaño y composición. Generalmente no tiene la capacidad de romper dipéptidos que contengan Pro en cualquier posición sin embargo puede hidrolizar tripéptidos que contengan Pro en la primera o segunda posición (Tan *et al.*, 1993; Kunji *et al.*, 1996).

La aminopeptidasa general C (Pep C) es una tiolpeptidasa de alrededor de 50 kDa, esta enzima muestra cierta similitud con la bleomicina hidrolasa de los mamíferos, enzima que se cree esta implicada en la degradación del glicopéptido bleomicina. Al igual que la

Pep N esta metalopeptidasa no tiene la capacidad de hidrolizar a los dipéptidos que contienen prolina pero muestra preferencia por los dipéptidos que contienen Ala, Leu, Lys en la posición N- terminal. Esta enzima es fuertemente inhibida por la yodoacetamida y el ácido p- cloromercuribenzoico.

- **Aminopeptidasas específicas**

Se ha aislado una aminopeptidasa específica para residuos amino-terminales de glutamato y aspartato (Pep A) en *L. lactis* subsp. *cremoris* HP la cual tiene un tamaño de 130 KDa estando conformada en subunidades idénticas de 43 kDa.

En la cepa de *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO 712 se ha logrado aislar una enzima con la misma especificidad (PepA) pero que también es capaz de liberar serina del extremo N. terminal. Su peso fue determinado mediante cromatografía de permeación en gel (245 KDa) (Law & Haandrikman, 1997).

Se han encontrado aminopeptidasas específicas para el rompimiento de residuos pirolglutámicos en el residuo N terminal, estas enzimas se denotan como (PCP). Estas proteínas de 25 kDa muestran cierta similitud con enzimas análogas en *B. subtilis* y *Streptococcus pneumonia*.

Dipeptidasas

La hidrólisis de dipéptidos en *L. lactis* puede llevarse a cabo por un gran número de enzimas como las aminopeptidasas (C y A) y la prolina iminopeptidasa. Sin embargo se ha purificado una metalopeptidasa de 100 kDa, la cual específicamente hidroliza dipéptidos. La dipeptidasa de *L. lactis* subsp. *cremoris* HG1 tiene la capacidad de hidrolizar todos los dipéptidos con excepción de los que contienen prolina. Se ha aislado una dipeptidasa de *L. lactis* subsp. *cremoris* Wg2, la cual es una metalopeptidasa monomérica de 51 kDa que no puede hidrolizar a los dipéptidos que contengan Gly o Gln en su posición N terminal.

Tripeptidasas

Los tripéptidos pueden ser hidrolizados por varias aminopeptidasas provenientes de las BAL. Se ha aislado una tripeptidasa específica (PepT) o aminotripeptidasa de *L. lactis* subsp. *cremoris* Wg2. Esta metaloenzima intracelular de 52 kDa es capaz de remover el residuo N terminal de los tripéptidos mientras que los di, tetra y oligopéptidos y los tripéptidos que contienen prolina en la penúltima posición no pueden ser hidrolizados por

esta enzima. Se ha aislado una tripeptidasa de 75 kDa de *L. lactis* subsp. *dacetylactis* CNRZ 267 que no es capaz de hidrolizar los tripéptidos con residuos Gly terminales (Law & Haandrikman, 1997).

Peptidasas Prolino específicas

Se cree que las peptidasas capaces de hidrolizar secuencias peptídicas que contienen prolina son importantes para la degradación de los péptidos derivados de la caseína debido al alto contenido de prolina en esta proteína (11.7% α -CN y 16.7% β -CN) y al hecho de que la mayoría de las BAL dependen de la caseína como única fuente de prolina. Las peptidasas generales como la Pep N, Pep C y PepT tienen la capacidad de romper oligopéptidos y tripéptidos que contienen prolina, pero su actividad es muy baja.

La prolina iminopeptidasa (PIP) de *L. lactis* es altamente específica para di y tripéptidos que contienen un residuo de prolina en el extremo N. Esta enzima se aisló como un dímero de 110 kDa (su masa monomérica es de 50 kDa). Esta metalopeptidasa intracelular es capaz de remover el residuo prolina del extremo N-terminal de di y tripéptidos pero no de tetrapéptidos. Al igual que la PepT, la PIP no puede hidrolizar péptidos que contengan prolina en la penúltima posición.

Para poder utilizar los oligopéptidos que contienen prolina los *Lactococcus* dependen de la actividad de una endopeptidasa o de la X-prolil-dipeptidil aminopeptidasa (PepX). La PepX es capaz de liberar dipéptidos a partir de oligopéptidos, aún cuando el penúltimo residuo sea prolina. También pueden ser liberados dipéptidos prolil- prolina- N-terminal a partir de oligopéptidos por la acción de la PepX. La PepX aislada de *L. lactis* subsp. *cremoris* es una serinoproteinasa de 90 kDa que presenta inhibición con PMSF y DFP (Law & Haandrikman, 1997).

3. Objetivos

3.1. General

Determinación y cuantificación de los péptidos potencialmente bioactivos generados mediante el sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* durante la fermentación de la leche

3.2. Particulares

- Estudiar el efecto que tiene la concentración de sólidos totales en la producción de péptidos potencialmente bioactivos.
- Estudiar el efecto que tiene el tiempo de almacenamiento sobre la concentración de péptidos producidos por una fermentación con *Lactococcus lactis*.
- Determinar el peso molecular aproximado de los péptidos obtenidos en la fermentación.
- Establecer con base en el peso molecular, la posible funcionalidad de los péptidos encontrados.

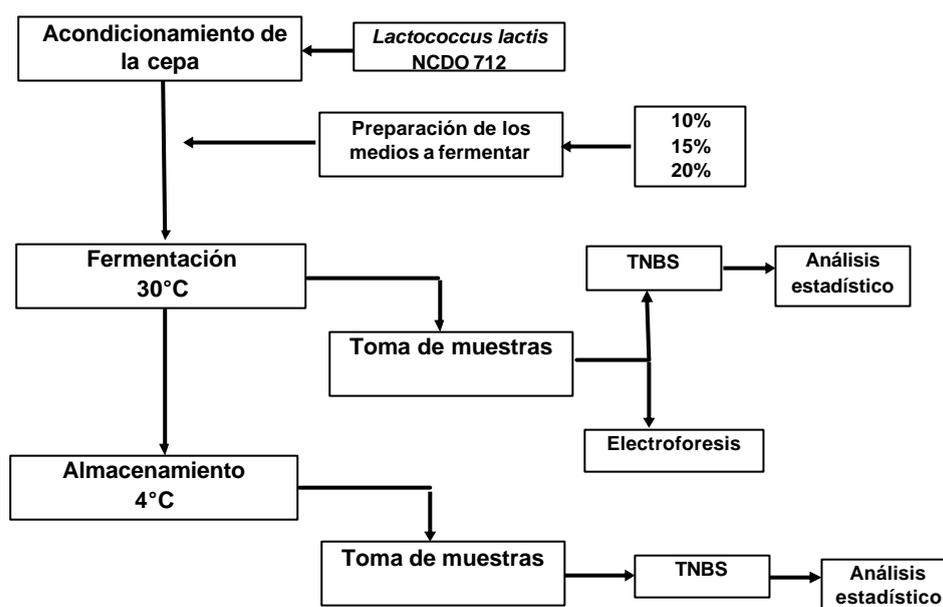
4. Hipótesis

Los péptidos bioactivos se encuentran encriptados dentro de las secuencias de las proteínas de la leche, para poder ejercer su efecto en el cuerpo necesitan ser liberados de estas secuencias. Mediante la fermentación de la leche con bacterias lácticas se han obtenido secuencias peptídicas con actividad fisiológica, por lo que posiblemente algunos péptidos generados por el sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* podrían tener alguna actividad fisiológica en el organismo.

5. Metodología

5.1. Plan de trabajo

El plan de trabajo propuesto fue el siguiente:



Cada una de las fermentaciones realizadas se hizo por duplicado. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete NCSS 2000.

El diseño experimental empleado fue el diseño por bloques. La variable respuesta es a cantidad de péptidos (medidos como grupos amino libres) y los bloques son la concentración de sólidos disponibles en las fermentaciones y el tiempo de fermentación.

5.2. Cepa utilizada

La cepa que fue utilizada para la obtención de péptidos fue *Lactococcus lactis* NCFB 712 de la Colección nacional de bacterias alimentarias del Reino Unido (National Collection of Food Bacteria, Reading, Reino Unido) antes conocida como NCDO (National Collection of Dairy Organism).

La cepa estaba conservada en forma de perlas utilizando leche como medio protector, almacenada a una temperatura aproximada de -15° C.

5.2.1. Acondicionamiento de la cepa

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

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

Para lograr la activación del microorganismo las perlas de *Lactococcus lactis* se inocularon en Litmus Milk previamente esterilizado, posteriormente se incubaron por un día a 30° C, temperatura reportada como óptima para esta cepa. Cuando los tubos con este medio presentaron crecimiento, se realizó una tinción de Gram para descartar cualquier tipo de contaminación. Una vez comprobada la pureza se procedió a inocular de este medio al medio MRS previamente esterilizado, y se incubó durante un día a una temperatura de 30° C. Este cultivo se inoculó al 5% en 100 mL de leche Svelty en matraces de 250 mL. Posteriormente del cultivo se inocularon al 5% en 100 mL de la leche Alpura al 10% la cual estaba contenida en matraces de 250 mL (leche con la que se realizaran las fermentaciones). En cada uno de estos cultivos se realizaron tinciones de Gram para descartar cualquier tipo de contaminación. Estos últimos cultivos se utilizaron para inocular los medios en los que se llevaron a cabo las fermentaciones.

5.3. Preparación de las leches para la fermentación

La preparación de cada uno de los medio utilizados se realizó de la siguiente manera.

- **Leche al 10%:** Se agregaron 60 gramos de leche Alpura en un matraz Erlenmeyer de 1 litro , posteriormente se disolvieron en 600 mL de agua y se esterilizó a 121° C durante 5 minutos

- **Leche al 15%:** En un matraz de 1 litro se colocaron 90 gramos de leche Alpura en polvo y 600 mL de agua destilada, esto se disuelve perfectamente y posteriormente se esteriliza a las mismas condiciones
- **Leche al 20%:** Se agregaron 120 gramos de leche Alpura en polvo a un matraz que contenía 600 mL de agua destilada, se homogenizó perfectamente y se esterilizó a 121° C durante 5 minutos.

5.4. Fermentación

Las leches con diferentes concentraciones de sólidos fueron inoculadas con el cultivo obtenido según se indica en el punto 5.2.1. Esto se realizó adicionando 30 mL (5 % de inóculo) de este cultivo a 600 mL de las leches con diferentes contenidos de sólidos. Posteriormente éstas fueron incubadas a una temperatura de 30 ° C durante dos días.

Durante la fermentación se tomaron 10 mL de muestra de cada una de las fermentaciones realizadas en los tiempos (0, 4, 8, 12, 20, 24, 32, 40 y 48 h). Con estas muestras se monitoreó el pH y la concentración de grupos amino libres por el método del Ácido Trinitrobencensulfónico (TNBS), fue determinada la concentración así como el peso molecular de los péptidos obtenidos.

5.5. Almacenamiento

Se tomaron 10 mL de muestra de las leches fermentadas almacenadas durante 15 días a 4°C. Las muestras fueron tomadas cada tercer día (1, 3, 6, 9, 12, 15) y se determinó la concentración de grupos amino libres por el método del TNBS en cada una de ellas. Las muestras se almacenaban en congelación hasta su procesamiento.

5.6. Determinación de grupos amino libres por el método del Ácido Trinitrobencensulfónico (TNBS)

Para cuantificar los péptidos que produjo la cepa utilizada (*Lactococcus lactis*) a partir de su crecimiento en leche gracias a su sistema proteolítico, se realizó la determinación de péptidos solubles por medio de la técnica del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS). Esta técnica mide grupos amino libres en hidrolizados proteicos. Este método propuesto por Adler

en 1979 se basa en la reacción del ácido trinitrobenzensulfónico (TNBS) con las aminas primarias en condiciones ligeramente alcalinas (pH 8.2). La reacción que se lleva a cabo se muestra en la figura 5.

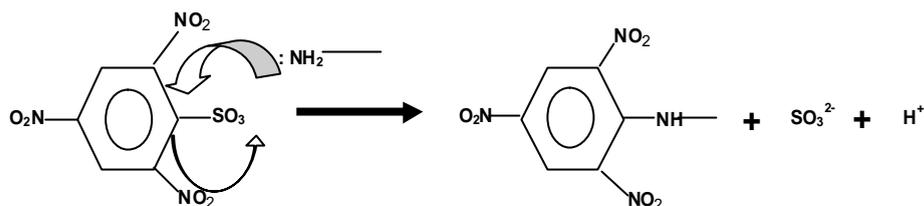


Figura 5 Reacción del TNBS con los grupos aminos

La preparación de las soluciones empleados en esta técnica se presenta en la sección 11.2.1.

Procedimiento:

1. Se agregaron 2 mL de buffer de fosfatos pH 8.2 en un tubo de reacción
2. Posteriormente se agregaron 0.250mL de la muestra
3. Se agregaron 2 mL de la solución de TNBS (Fluka, Buchs, Suiza) al 0.10%
4. Se agitó bien el tubo de reacción y se incubó a una temperatura de 50° C durante 60 minutos. Se debe de mantener los tubos de reacción aislados de la luz
5. Terminado el tiempo se detuvo la reacción agregando 4 mL de HCl 0.1N
6. Los tubos se leyeron a 340 nm contra un blanco conformado por los reactivos y el agua desionizada

Se elaboró una curva patrón utilizando una solución de Glicina 3mM con 1% de SDS y posteriormente se hicieron diluciones de ésta para cada uno de los puntos de la curva. (ver apéndices 10.4.1.).

5.7. Electroforesis en gel de Poliacrilamida – SDS (SDS-PAGE)

La electroforesis es un método analítico en el que se separan biomoléculas por la acción de un campo eléctrico, éstas migran en función de su carga, su peso y su estructura tridimensional (García, 2000; Maier, 1982). Es un método de alta sensibilidad y resolución. Se utiliza una electroforesis discontinua con un gel concentrador para tener una mayor resolución, además de que permite la aplicación de las muestras sin una previa concentración. Se ocupó un gel separador para diferenciar las moléculas.

La electroforesis con duodecil sulfato de sodio (SDS) sirve para estimar el peso molecular de los péptidos ya que éste desnaturaliza las proteínas. También se utiliza un agente reductor (β -mercaptoetanol) para reducir los puentes disulfuro de las proteínas. Debido a que todos los complejos proteína-SDS tienen la misma densidad de carga y conformación, la separación ocurre en función del peso molecular. Al graficar el log del peso molecular (PM) de las proteínas del patrón en función del valor de RF (medida de la movilidad de la proteína con respecto al frente de migración) se obtiene un gráfico en donde se pueden determinar los pesos moleculares desconocidos por regresión lineal o interpolación en la curva (García, 2000).

El método utilizado fue una adaptación del método de Schägger y Von Jagow (1987) para la determinación de péptidos y proteínas de bajo peso molecular. La tricina empleada en este método en lugar de la glicina nos permite una mayor resolución de las proteínas o péptidos de bajo peso molecular.

Preparación de muestras

Las muestras se centrifugaron a 10000 RPM durante 30 minutos a 4°C.

- Se tomaron alícuotas de 40 μ L y se depositaron en viales de 1.5 mL. Se agregaron 20 μ L de buffer de la muestra (a la cual se le adicionó 1.5 μ L de β -mercaptoetanol)
- Estos viales fueron incubados durante 30 minutos a 40°C y posteriormente se depositaron las muestras en los carriles del gel

Preparación de los geles

1. Se preparó un gel de separación * con una T del 20% y una C del 6% con un pH de 8.45. Esto se preparó con un día de anticipación debido a que el gel debe polimerizarse durante al menos 16 horas
2. Se preparó posteriormente el gel de concentración con una T del 4% y una C de 6% con pH de 8.45 y se dejó polimerizar por espacio de una hora
3. Se prepararon la muestras y 300 mL de la solución amortiguadora de corrida a un pH de 8.45*
4. Los geles fueron corridos en un sistema Miniprotean III (Bio-Rad, Hercules, USA). Se inyectó un estándar de amplio espectro y uno de péptidos (Bio-Rad, Hercules, USA) en los geles, los cuales fueron preparados como se explica en el anexo10.2.2.2.7.
5. Se utilizó un voltaje de 30V hasta que las muestras alcanzaran el gel de separación (aproximadamente una hora). Posteriormente se aumentó el voltaje a 95 V dejando correr las muestras hasta que el frente de corrida llegase al extremo inferior de los cristales.

Es importante mantener la cámara de electroforesis en hielo durante todo el tiempo de la corrida de las muestras, ya que el alto voltaje puede causar un calor excesivo en gel y provocar variaciones en la movilidad de los segmentos polipeptídicos. .

Teñido y desteñido de los geles

1. Al terminar de correr la electroforesis, los geles son sacados y colocados en una solución desteñidora (metanol, 50% 10% ácido acético). Se dejan en esta solución por espacio de una hora.
2. Se colocaron los geles en SYPRO RUBI (Bio-Rad, Hercules, USA) durante 16 horas.
3. Posteriormente los geles fueron colocados de nuevo en la solución desteñidora para quitar el exceso del SYPRO RUBI aproximadamente por 4 horas.
4. Por último los geles son enjuagados con agua desionizada y se tomaron imágenes de éstos en el Gel-Doc 100 (Bio-Rad, Hercules, USA).

*Utilización del sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* para la generación de péptidos potencialmente bioactivos*

De acuerdo con los estándares utilizados (Amplio Espectro y de Polipéptidos de Bio-Rad ver sección 10.3 de los apéndices) se puede considerar péptido a las fracciones que migran después de la lisozima (14.4 kDa). Esta zona es indicada en cada gel de electroforesis para cada una de las fermentaciones realizadas. Se utilizó el programa Molecular Analyst (Bio-Rad, Hercules, USA) para la determinación de la concentración de cada uno de los péptidos generados.

* La preparación de las soluciones utilizadas para los geles de electroforesis se presenta en la sección 10.2.2.

6. Resultados y discusión

6.1.1. Generación de grupos amino libres durante la fermentación

A partir de la determinación de la concentración de grupos amino libres para cada uno de los puntos analizados de las tres fermentaciones realizadas con diferentes concentraciones de sólidos de leche (10%, 15% y 20%) y los datos de pH obtenidos se generó el gráfico 1. En este gráfico se observa que la concentración inicial de grupos amino es proporcional a la cantidad de sólidos de leche que se utilizaron para cada una de las fermentaciones. Se aprecia que la cantidad de grupos amino libres iniciales encontrados en las fermentaciones con el 10% de sólidos eran aproximadamente la mitad de los encontrados en las fermentaciones con el 20% de sólidos. También en este gráfico se observa que la concentración de grupos amino libres va aumentando conforme transcurre el tiempo en las tres fermentaciones, lo anterior indica que existe una degradación de las proteínas de leche por la acción del sistema proteolítico de *Lactococcus lactis*. Esta degradación de las proteínas de la leche, principalmente de las caseínas (Juillard *et al.*, 1995), es lo que sustenta el crecimiento de esta bacteria láctica en la leche, ya que la cantidad inicial de aminoácidos libres que se encuentra presente en la leche es insuficiente para que el microorganismo pueda crecer óptimamente (Juillard *et al.*, 1996). La concentración máxima de péptidos (grupos amino libres) en las fermentaciones realizadas se alcanza durante las 28 y 32 horas de fermentación.

A partir de la hora 32 de fermentación se observó una disminución en la cantidad de péptidos en las tres fermentaciones, esto último puede deberse a que existe un consumo de péptidos mayor a los generados por parte del microorganismo, ya que éstos son requeridos para la obtención de aminoácidos esenciales para su crecimiento, aunado a una disminución en la actividad proteolítica de *Lactococcus lactis*, muy posiblemente debido a que el intervalo óptimo de pH para las proteinasas y peptidasas de su sistema proteolítica es de 5.5 a 6.5 y 5.8 a 8, respectivamente, y el valor de pH durante las últimas horas de fermentación (a partir de la hora 32) es inferior a 5 (Kunji *et al.*, 1996). La disminución en la actividad proteolítica de la cepa también puede deberse a la regulación del sistema proteolítico por la concentración

de algunos aminoácidos que se encuentren disponibles en el medio de fermentación (principalmente Ile, Leu y Val) ya que estos aminoácidos activan la expresión del represor CodY, el cual reprime la expresión de los genes del sistema proteolítico (Savijoki *et al.*, 2006). También se ha observado que varias secuencias peptídicas generadas durante las fermentaciones con bacterias ácido lácticas como los fragmentos la β -CN f (58-72), (58-70), (60-70) y (60-66) pueden inhibir a algunas endopeptidasas del sistema proteolítico y por lo tanto disminuir la capacidad proteolítica de éstas (Smacchi & Gobbetti, 2000).

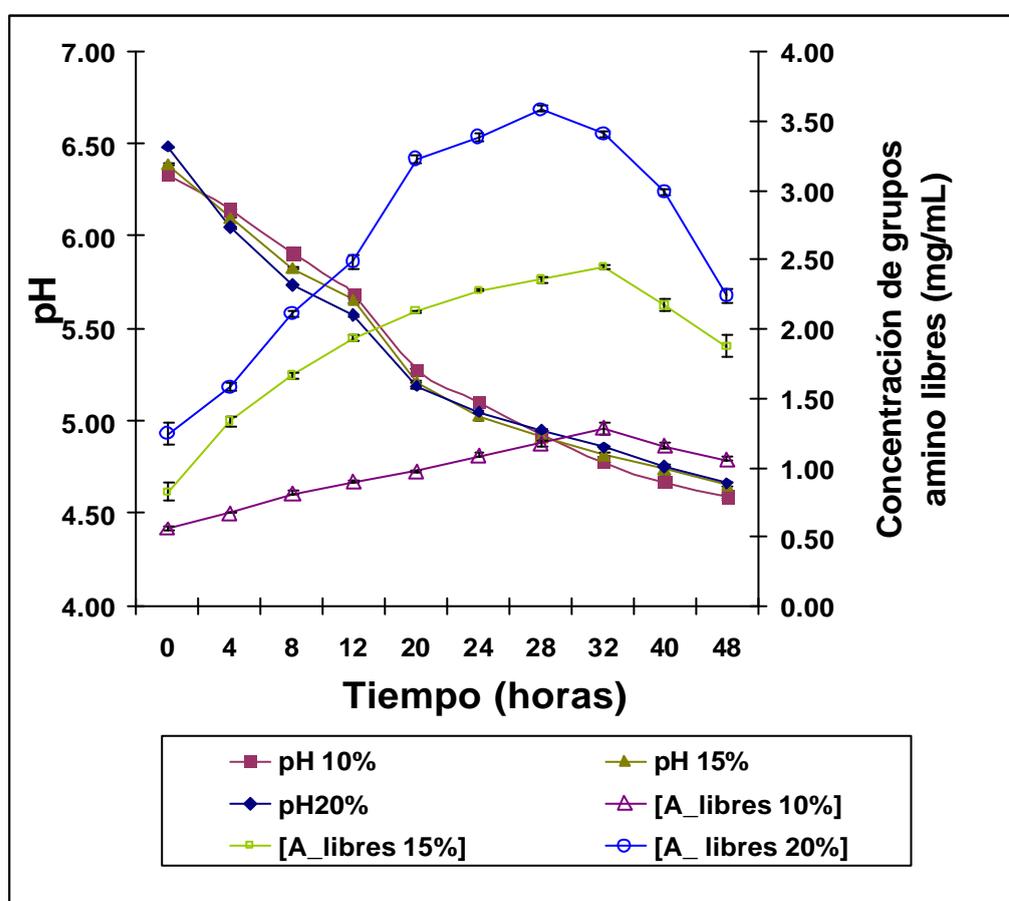


Gráfico 1 Concentración de los grupos amino libres y comportamiento de pH durante las fermentaciones, a diferentes concentraciones de leche. Los datos graficados son el promedio de las dos fermentaciones

Con el fin de observar solamente la cantidad de grupos amino libres generados (péptidos) por la acción del sistema proteolítico durante las fermentaciones realizadas se restó la cantidad inicial de grupos amino libres de cada una de las fermentaciones a cada

uno de los puntos obtenidos durante la fermentación. Con estos valores se construyó el gráfico 2.

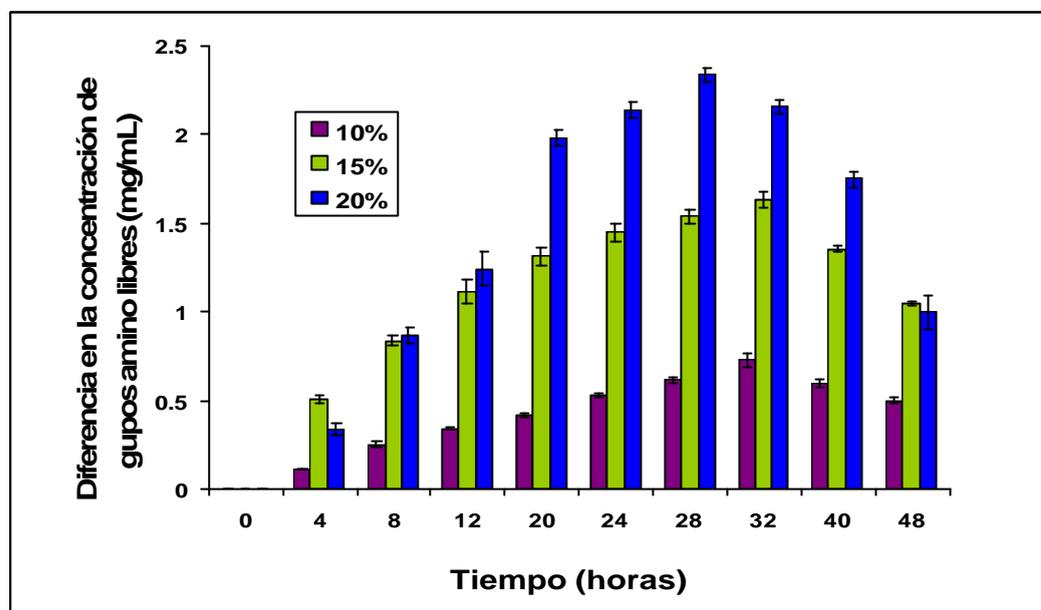


Gráfico 2 Generación de grupos amino libres durante las fermentaciones. Los datos graficados son el promedio de las dos fermentaciones

En este gráfico es muy notoria la acumulación de los péptidos generados durante la fermentación. En 1995 Juillard y colaboradores mencionaron que no todos los péptidos generados por el sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* eran utilizados para el crecimiento de la bacteria por lo que una cantidad de éstos podía acumularse durante la fermentación.

Se observó en este gráfico que durante las primeras horas, las fermentaciones realizadas con el 15% de sólidos presentaban una mayor cantidad de péptidos generados que las realizadas con el 20% de sólidos, pero que a partir de la hora 20 de fermentación esto se revertía llegando a una concentración de péptidos generada cercana a 2.30 mg/mL a las 32 horas. La concentración de péptidos generados en las fermentaciones realizadas con el 10% de sólidos de leche siempre se encontraron por debajo de las concentraciones de péptidos producidos en las otras fermentaciones.

Se realizó un análisis estadístico de las tres fermentaciones realizadas con *Lactococcus lactis* en donde se variaron la cantidad de sólidos de leche presentes en el medio de fermentación, por medio del paquete estadístico NCSS 2000. En este paquete se

realizó un análisis de varianza por comparación de medias. Por medio de este análisis podemos inferir que la concentración de sólidos disponibles para la fermentación, el tiempo y la interacción entre estas dos variables influyen significativamente sobre la cantidad de péptidos que se producen. El análisis estadístico nos muestra que existen diferencias significativas con respecto a la cantidad de péptidos generados al variar las cantidad de sólidos de leche disponibles para la fermentación, siendo las que contienen un 20% de sólidos las que generan una mayor cantidad de péptidos. En este análisis también se observó que no existe diferencia estadística en la concentración de péptidos generados entre los tiempos 28 y 32 horas, que es donde las fermentaciones alcanzan su máxima concentración de péptidos generados.

Se calculó el rendimiento de la concentración de péptidos (aumento en la cantidad de grupos amino libres) con respecto a la cantidad de proteína de leche teórica disponible por cada mL, para cada fermentación, estos rendimientos se muestran en la tabla 5. La cantidad de proteínas teórica disponible para las fermentaciones es de 26 mg/ml para la de 10%, 39 mg/mL para la de 15% y 52 mg/mL para la de 20%. Los rendimientos mostrados en la tabla 6 son los promedios de dos repeticiones realizadas por cada fermentación.

Tabla 5 Rendimiento de la concentración de péptidos con respecto a la cantidad de proteína disponible para cada una de las fermentaciones

Tiempo de fermentación (horas)	% de Rendimiento de la concentración de péptidos con respecto al contenido de proteína total para cada una de las fermentaciones		
	10%	15%	20%
0	0	0	0
4	0.44	1.31	0.65
8	0.96	2.14	1.67
12	1.31	2.85	2.39
20	1.59	3.36	3.80
24	2.04	3.71	4.11
28	2.36	3.94	4.50
32	2.80	4.19	4.15
48	1.91	2.69	1.94

En esta tabla se observa que los porcentajes de rendimiento de las fermentaciones realizadas con el 10% de sólidos eran muy inferiores a los encontrados en las otras dos fermentaciones. También se observa que el porcentaje de rendimiento promedio de las fermentaciones efectuadas con el 15% de sólidos de leche es superior al encontrado para

las fermentaciones realizadas con el 20%, aunque en los tiempos donde se encuentran los máximos (28 a 32 horas) se tiene un porcentaje ligeramente mayor de rendimiento en las fermentaciones efectuadas con el 20% de sólidos de leche.

Se realizó el análisis estadístico de los rendimientos obtenidos, el cual indicó que existen diferencias significativas con respecto al porcentaje de rendimiento al variar la cantidad de sólidos pero en los tiempos 28 y 32 (cuando se obtiene una mayor concentración de péptidos generados) la diferencia entre los rendimientos encontrados de las fermentaciones realizadas con el 15 y el 20% de sólidos no son significativas. Posiblemente esto se debe a que la actividad de agua en los medios de fermentación va disminuyendo conforme aumenta la concentración de sólidos totales teniendo una influencia sobre el metabolismo microbiano.

6.1.2. Determinación de grupos amino libres durante el almacenamiento en refrigeración

Además de las graficas obtenidas para cada una de las fermentaciones, también se realizó el monitoreo de la concentración de grupos amino libres durante 15 días a una temperatura de 4° C para observar el efecto que tiene el almacenamiento sobre los péptidos producidos y poder observar el comportamiento que podrían presentar éstos en un producto lácteo fermentado. En el gráfico 3 se muestra el efecto que tiene el almacenamiento sobre la concentración de grupos amino en cada una de las fermentaciones realizadas.

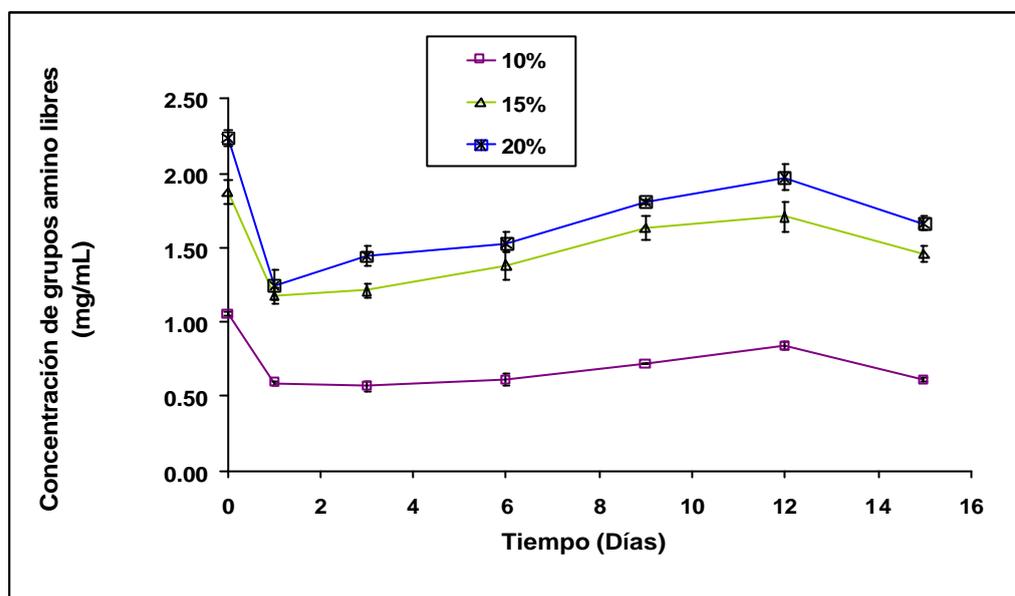


Gráfico 3 Concentración de grupos amino libres durante el almacenamiento a 4° C. Para las diferentes concentraciones de sólidos empleadas en las fermentaciones

En este gráfico se puede observar que existe un decremento en la concentración de los grupos amino libres durante el primer día de almacenamiento el cual podrá posiblemente deberse a que la cantidad de péptidos consumidos es mayor a la cantidad de péptidos generados (acumulación) por el sistema proteolítico debido al cambio brusco de temperatura (de 30°C a 4°C) al que fueron sometidos las fermentaciones.

Posteriormente existe un pequeño aumento en la concentración de grupos amino sobre todo en las fermentaciones realizadas con el 15 y el 20% hasta el día 12 de almacenamiento, esto posiblemente se deba a que las enzimas del sistema proteolítico lograron adaptarse a las condiciones de pH y temperatura y siguen teniendo actividad proteolítica, aunque en menor grado que durante el tiempo de fermentación ya que las condiciones del medio de fermentación eran menos adversas, a partir de este día la concentración de grupos amino libres en las fermentaciones realizadas empieza a disminuir.

Se realizó un análisis estadístico con ayuda del mismo paquete estadístico NCSS 2000; el análisis de varianza arrojó que la concentración de sólidos totales, el tiempo de almacenamiento y la interacción de ambas son variables que influyen sobre la concentración de grupos amino libres en cada una de las fermentaciones realizadas. La concentración de

grupos amino libres durante el tiempo de almacenamiento para las fermentaciones de 20% es estadísticamente diferente a las obtenidas en las fermentaciones realizadas con el 15 y el 10% de sólidos. Durante el periodo de almacenamiento se observa una disminución significativa de la concentración de grupos amino libres de cada una de las fermentaciones con respecto con a la obtenida durante la fermentación lo cual puede deberse a las proteinasas y peptidasas de su sistema proteolítico que no se encuentran a su temperatura y pH óptimo.

6.2. Determinación de péptidos por electroforesis SDS-PAGE

A partir de la imagen del gel de electroforesis, se pudieron determinar: i) la concentración de los péptidos obtenidos durante las fermentaciones y ii) los pesos moleculares aproximados de estos péptidos.

6.2.1. Determinación de los péptidos generados en las fermentaciones realizadas con 10% de sólidos de leche

En la figura 6 se puede observar la aparición de bandas de fracciones peptídicas menores a 14.4 kDa (el cual es el peso molecular correspondiente a la α -LA y que se toma como referencia para diferenciar entre péptidos y proteínas), para cada uno de los tiempos de fermentación inyectados en el gel de electroforesis, estas bandas son más notorias en las horas 20 y 28 de fermentación. Las fracciones menores a 14.4 kDa tienen gran importancia, ya que los péptidos reportados como bioactivos tienen peso moleculares menores a éste. Smacchi y Gobbetti en 2000 reportan la existencia de fracciones peptídicas en el yogurt de hasta 10 kDa que presentan actividades biológicas.

También en esta figura se observa la disminución de la concentración de algunas proteínas de la leche sobre todo de algunas fracciones de la caseína (α y probablemente α_{s1}) y la β -LG.

Con ayuda de la tricina, la cual es utilizada para sustituir a la glicina de la electroforesis convencional, se lograron separar los péptidos obtenidos durante la fermentación de la leche por la acción de *Lactococcus lactis*.



Figura 6 Separación de los péptidos generados por las fermentaciones realizadas con el 10% de sólidos de leche en electroforesis en gel de poliacríamida-SDS-tricina desnaturalizante T=20% y C =6%. La tinción se realizó con Spyro Rubi. ST de pesos moleculares (Polypeptide de Bio-Rad). El tiempo se reporta en horas.

Se realizó el cálculo para la concentración de los péptidos generados durante la fermentación por una comparación de áreas, estas áreas se calcularon por medio del programa Molecular Analyst el cual se encuentra integrado al Gel Doc de Bio-Rad. Se tomó como referencia a la a-LA en una concentración de 1mg/mL. Las concentraciones de los péptidos generados por *Lactococcus lactis* se reportan en la tabla 6. En esta tabla se aprecia que la cantidad de péptidos menores a 14.4 kDa aumenta hasta llegar al tiempo 28 en donde se aprecia un decaimiento en la concentración de éstos; lo anterior concuerda con lo obtenido en el método de TNBS en donde se observa este mismo comportamiento.

Tabla 6 Concentración total de los péptidos menores a 14.4 kDa generados por *Lactococcus lactis* durante la fermentación de una leche con 10% de sólidos

Tiempo de fermentación (Horas)	Concentración total de péptidos (mg/mL)
0	0.20
8	0.24
12	0.30
20	0.37
28	0.47
48	0.35

Con ayuda de la curva obtenida con el patrón de pesos moleculares (ver sección 10.4.2.), se pudo estimar el peso molecular de los péptidos obtenidos durante la fermentación. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7. En esta tabla se observa

que a partir de la hora 8 de fermentación se obtienen péptidos menores a los 6.6 kDa, los cuales tienen una gran posibilidad de poseer actividades biológicas. En los tiempos 20 y 28 se observa que existe una mayor cantidad de fragmentos peptídicos secuencias menores a 14.4 kDa. El rango de los péptidos obtenidos va de 13.54 a 0.738 kDa. En el tiempo 48 de fermentación se observa la desaparición de los fragmentos peptídicos de mayor peso molecular (13.54 y 11.24 kDa).

Se realizó una comparación de los pesos moleculares de los péptidos determinados mediante la electroforesis con los pesos moleculares de los péptidos reportados como bioactivos. Los péptidos que coincidieron con los pesos moleculares de las secuencias bioactivas se reportan en la tabla con letras negritas.

Tabla 7 PM de los péptidos generados durante la fermentación de una leche con 10% de sólidos con *Lactococcus lactis*

T=0 Horas	T=8 Horas	T=12 Horas	T=20 Horas	T=28 Horas	T=48 Horas
13544.68	13544.68	13544.68	13544.68	13544.68	9342.08
11248.80	11248.80	11248.80	11248.80	11248.80	5693.03
9342.08	9342.08	6056.63	9342.08	9342.08	3469.32
	3806.93	3806.93	6056.63	6056.63	2625.73
	2180.66	2180.66	3690.89	4444.20	1702.31
	1249.11	1249.11	2625.73	2625.73	975.10
		738.00	1867.97	2180.66	
			1211.03	1288.38	
			835.28	975.10	

Se construyó un gráfico de la concentración de los péptidos menores a 7 kDa en cada una de las muestras analizadas por electroforesis (gráfico 4). En este gráfico se aprecia como varían los péptidos de cierto peso molecular a lo largo de la fermentación. En el tiempo 8 de fermentación se encuentran secuencias peptídicas de 3, 2 y 1 kDa, en el tiempo 12 se observa la aparición de péptidos de mayor peso molecular (6 kDa) resultado de la hidrólisis de proteínas y péptidos de mayor peso molecular, que no se observan en esta figura pero que están presentes en las muestras. También durante este tiempo se observa un aumento en la cantidad de péptidos de peso molecular intermedio (3 y 2kDa), los péptidos de 1 kDa disminuyen su concentración seguramente porque son degradados a aminoácidos o bien son consumidos por el microorganismo. En el tiempo 20 se observa una degradación de las fracciones peptídicas de 6, 3 y 2 kDa para formar secuencias peptídicas de menor tamaño (1 kDa). Esto concuerda con lo propuesto por Tan y colaboradores en 1993 los cuales

plantearon que los segmentos peptídicos de bajo peso molecular (1 kDa y menores) eran generados a partir de secuencias peptídicas de mayor tamaño por la acción de las peptidasas de su sistema proteolítico. Durante el tiempo 28 se observa la acumulación de fracciones peptídicas de 6, 4 y 2 kDa derivados de la hidrólisis de segmentos peptídicos de mayor tamaño, también se observa un aumento en la concentración de los péptidos menores a 1 kDa la cual puede explicarse por la disminución de péptidos de 1 y 3 kDa. En el último tiempo de la fermentación se observa la aparición de secuencias peptídicas de 5 kDa y 3 kDa también se observa la degradación de péptidos de 6, 2 y menores de 1 kDa.

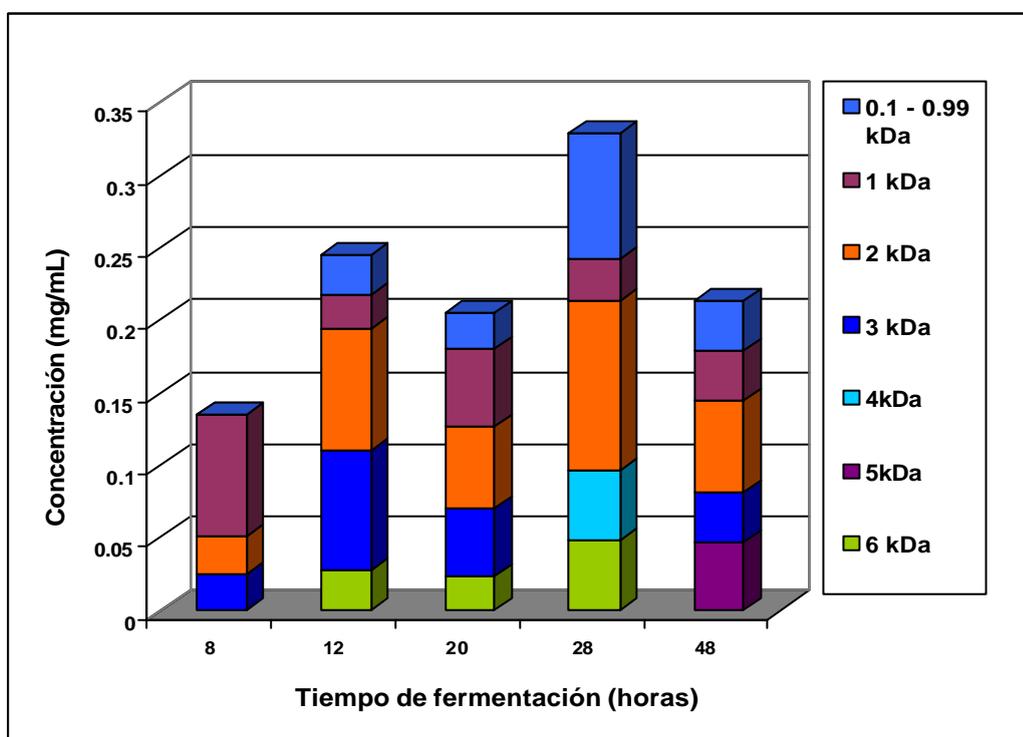


Gráfico 4 Perfil de péptidos menores a 7 kDa generados por *Lactococcus lactis* durante una fermentación en un medio con 10% de sólidos de leche

6.2.2. Determinación de los péptidos generados en las fermentaciones realizadas con 15% de sólidos de leche

En la figura 7 se aprecia la aparición de bandas correspondientes a fracciones peptídicas menores a 14. 4 kDa en todos los tiempos de fermentación analizados por electroforesis; se observa que la concentración va en aumento conforme transcurre la

fermentación, siendo mas evidentes las bandas en los tiempos 24 y 32. En el tiempo 48 se aprecia una disminución en la cantidad de bandas, lo anterior concuerda con lo determinado con el método del TNBS, en donde se encontró una disminución en la concentración de grupos amino libres en ese tiempo.

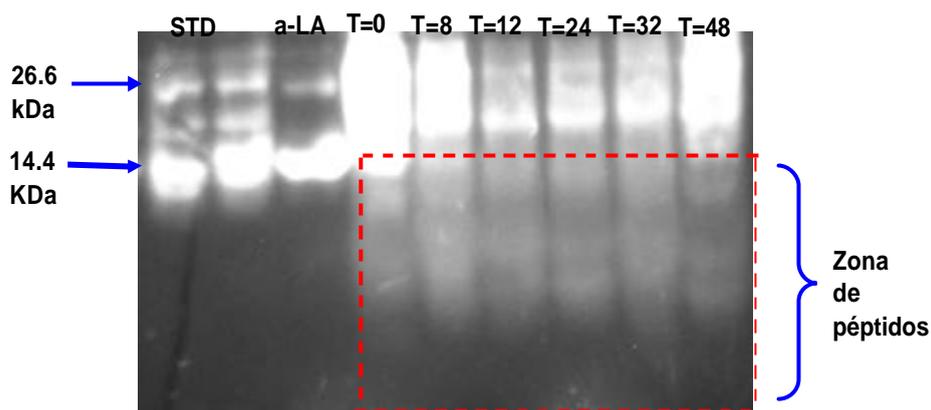


Figura 7 Separación de los péptidos generados por las fermentaciones realizadas con el 15% de sólidos de leche en electroforesis en gel de poliacríamida-SDS-tricina desnaturizante T=20% y C =6%. La tinción se realizo con Spyro Rubi. ST de pesos moleculares (Polypeptide de Bio-Rad). El tiempo se reporta en horas.

Mediante comparación de áreas se determinó la concentración de los péptidos generados por estas fermentaciones. Se tomó como referencia la a-LA en una concentración de 1mg/mL. Las concentraciones se reportan en la tabla 8, en ésta se observa un aumento en la concentración conforme avanza la fermentación hasta llegar a su máximo en la hora 32, este comportamiento concuerda con lo obtenido por TNBS.

Tabla 8 Concentración total de los péptidos (menores a 14.4 kDa) generados por *Lactococcus lactis* durante la fermentación de una leche con 15% de sólidos

Tiempo de fermentación (Horas)	Concentración total de péptidos (mg/mL)
0	0.53
8	0.76
12	0.91
24	1.07
32	1.18
48	0.84

El peso molecular aproximado de las fracciones peptídicas generadas en las fermentaciones realizadas con el 15 % de sólidos de leche se muestra en la tabla 9, en la cual se observa que a partir de la octava hora de fermentación se tienen fracciones peptídicas menores de 6.6 kDa. El rango de los pesos moleculares de los péptidos encontrados en esta fermentación va de 13.66 a 0.85 kDa. En la hora 12 de fermentación se obtuvieron un mayor número de fragmentos peptídicos. Durante la última hora de fermentación se observa la degradación de las fracciones peptídicas de mayor tamaño (13.66 y 8.92). Se realizó una comparación del PM de los fragmentos obtenidos con los PM de los péptidos reportados como bioactivos, los péptidos que coinciden con éstos últimos son reportados con letras negritas.

Tabla 9 PM de los péptidos generados durante la fermentación de una leche con 15% de sólidos con *Lactococcus lactis*

T=0 Horas	T=8 Horas	T=12 Horas	T=24 Horas	T=32 Horas	T=48 Horas
13667.80	13667.80	13667.80	13667.80	13667.80	8920.34
11041.80	11041.80	9409.06	9409.06	9409.06	5821.90
9409.06	5821.90	6477.30	5821.90	4227.43	4227.43
	4227.43	4961.02	4227.43	2910.21	3069.65
	3069.65	4227.43	2759.05	1899.36	1899.36
	2351.07	2759.05	1899.36	1618.50	1454.74
	1899.36	1899.36	1175.24	1454.74	853.37
	1001.46	1175.24	853.37	853.37	
		853.37			

En el gráfico 5 se observa como van evolucionando los péptidos menores a 7 kDa durante las fermentaciones, a partir de la hora 12 de fermentación se presentan péptidos de bajo peso molecular (menores a 1 kDa), los cuales son generados a partir de secuencias peptídicas de mayor peso molecular (2 y 1 kDa). Los péptidos de peso molecular intermedio (2, 3 kDa) pueden ser generados por la hidrólisis de fragmentos de mayor peso molecular (4, 5 y 6 kDa). Las secuencias peptídicas mayores a los 4 kDa son generadas por la degradación de proteínas o péptidos de mayor peso molecular que no se aprecian en el gráfico pero que se encuentran en las muestras. El comportamiento de los péptidos en este gráfico concuerda con lo reportado por Gasson y De Vos en 1994, los cuales propusieron que la formación de los péptidos de menor peso molecular se debe a la degradación de los péptidos de peso molecular intermedio, los cuales a su vez se generaban de la hidrólisis de secuencias peptídicas de mayor peso molecular, este fenómeno es conocido como la formación escalonada de péptidos.

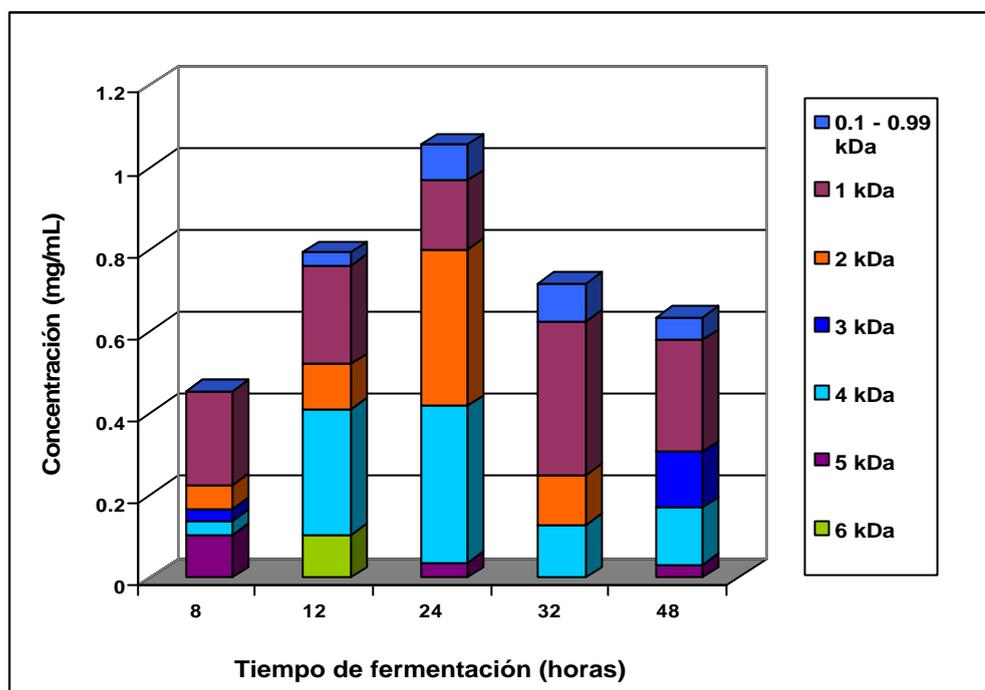


Gráfico 5 Perfil de péptidos menores a 7 kDa generados por *Lactococcus lactis* durante una fermentación en un medio con el 15% de sólidos de leche

6.2.3. Determinación de péptidos generados en las fermentaciones realizadas con 20% de sólidos de leche

En la figura 8 se puede observar que en cada una de las muestras analizadas con el 20% de sólidos; se encontraban bandas que correspondían péptidos menores a 14.4 kDa, mas aún, fueron encontradas bandas menores a los 6.6 kDa. También se observa que la concentración de estos péptidos generados por la acción del sistema proteolítico se va elevando conforme transcurre la fermentación hasta la hora 32 de fermentación, ya que a las 48 horas de fermentación se observa una disminución en la concentración de los péptidos, esto concuerda con lo obtenido con el método de TNBS, en el cual se observó una disminución en la cantidad de grupos aminos libres en ese tiempo de fermentación. En esta figura se observa la disminución de la α -CN, la β -LG, la α -LA y posiblemente la α 1-CN.

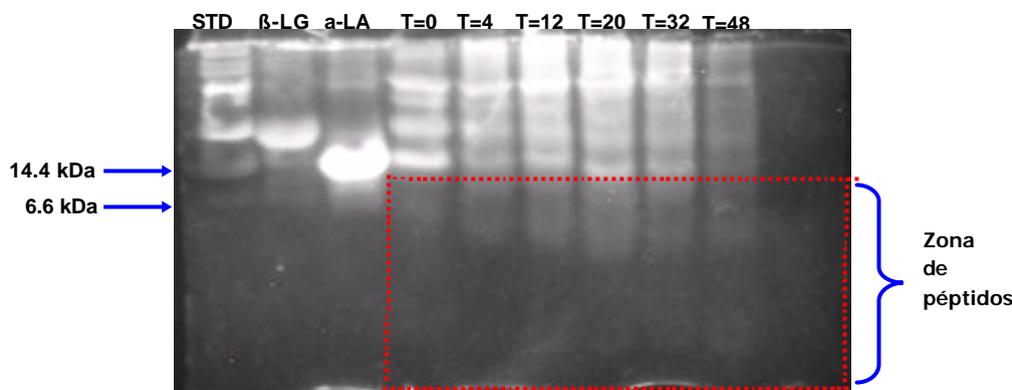


Figura 8 Separación de los péptidos en electroforesis para las fermentaciones con 20% de sólidos realizadas en gel de poliacríamida-SDS desnaturalizante. La tinción se realizó con Spyro Rubi. La T=20% y C =6%. ST de pesos moleculares (Broad de Bio-Rad). El tiempo se reporta en horas.

Se realizó el cálculo para la concentración de los péptidos generados durante la fermentación por una comparación de áreas, tomando como referencia a la β-LG (1mg/mL). La concentración de los péptidos en los distintos tiempos de fermentación analizados se reporta en la tabla 10, en la cual se observa que la concentración máxima de péptidos se encuentra durante la hora 20 pero no existe gran diferencia con la del tiempo 32. Posteriormente en el tiempo 48 la concentración de los péptidos disminuye, lo cual también coincidió con lo obtenido por el método de TNBS.

Tabla 10 Concentración total de los péptidos generados por *Lactococcus lactis* durante la fermentación de una leche con 20% de sólidos

Tiempo de fermentación (Horas)	Concentración total de péptidos (mg/mL)
0	0.71
4	1.02
12	1.03
20	1.24
32	1.17
48	1.01

Se calculó el PM de los péptidos obtenidos durante esta fermentación. Los resultados se muestran en la tabla 7. En esta tabla se observa que a partir de la hora 4 de fermentación se obtienen péptidos menores a los 6.6 kDa, los cuales tienen una gran posibilidad de poseer actividades biológicas. Se realizó una comparación bibliográfica con los pesos

obtenidos por la electroforesis con aquellos que han sido reportados como bioactivos, encontrándose algunas secuencias posiblemente bioactivas, las cuales se marcaron en la tabla con letras negritas. También en esta tabla se observa que estas secuencias potencialmente bioactivas se encuentran desde las primeras cuatro horas hasta el término de la fermentación (a las 48 horas). Se observa también que durante los tiempos 20 y 32 se encuentran una mayor cantidad de péptidos (11 péptidos). Se aprecia la desaparición de los fragmentos peptídicos de peso molecular superior a 8 kDa a partir de la hora 12 de fermentación, cosa que no sucedió con las otras fermentaciones realizadas en donde se encuentran secuencias con mayor tamaño hasta la hora 32.

Tabla 11 PM generados durante la fermentación de una leche con 20% de sólidos con *Lactococcus lactis*

T=0 Horas	T=4 Horas	T=12 Horas	T=20 Horas	T=32 Horas	T=48 Horas
13530.23	13530.23	7900.64	7900.64	7900.64	7900.64
11309.00	11309.00	6220.43	6220.43	6220.43	6220.43
10034.68	9174.09	3973.00	4753.34	4753.34	4753.34
	5686.96	3128.07	3973.00	4217.73	3973.00
	4217.73	1997.90	3128.07	3421.51	2693.87
		1481.74	2693.87	3128.07	1997.90
		975.10	1997.90	2390.32	1573.01
		569.39	1481.74	1573.01	975.10
		374.70	975.10	975.10	569.39
			569.39	569.39	374.70
			374.70	374.70	

En el gráfico 6 se observa que a las 4 horas de fermentación sólo se encuentran fragmentos peptídicos de 4 y 5 kDa, resultado de la hidrólisis de secuencias de mayor peso molecular, a partir de la hora 12 se encuentran fragmentos peptídicos de 3, 1 y menores a 1 kDa, los cuales pueden provenir de la proteólisis de los fragmentos peptídicos (de 4 y 5 kDa). Se aprecia que los fragmentos peptídicos menores a 1 kDa se conservan durante todo el tiempo de fermentación, no ocurre lo mismo con los fragmentos de 1, 2, 3 kDa, los cuales pueden acumularse y después ser degradados a péptidos de menor tamaño, esto se observa claramente en los péptidos de 3 kDa los cuales son degradados para generar fragmentos peptídicos de 2 kDa principalmente (durante el tiempo 20 y 32).

El comportamiento que se presenta en este gráfico concuerda con lo planteado por Gasson y De Vos en 1994 en donde se dice que la formación de péptidos de menor peso molecular y que pueden tener importancia biológica se da de forma escalonada, es decir, se

parte de la proteína, la cual se hidroliza para dar lugar a un péptido de peso molecular elevado para que éste se vuelva a hidrolizar para formar péptidos de tamaño intermedio, y posteriormente finalizar con péptidos de bajo peso molecular.

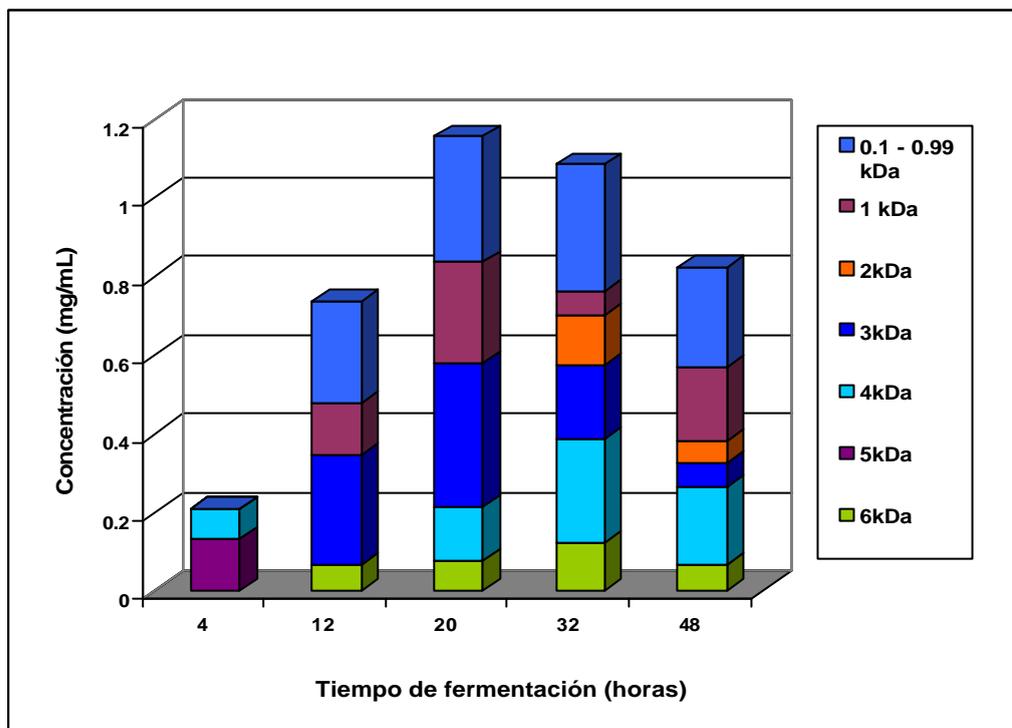


Gráfico 6 Perfiles de péptidos menores a 7 kDa en las fermentaciones realizadas con *Lactococcus lactis* en un medio preparado con 20% de sólidos de leche.

Por los resultados obtenidos mediante la electroforesis de las tres fermentaciones realizadas se puede concluir que los péptidos obtenidos en éstas oscilan entre los 13.7 y 0.37 kDa, lo cual era esperado ya que se ha reportado que la existencia de péptidos en leches fermentadas con bacterias lácticas con peso moleculares dentro del mismo rango. También se encontró que las fermentaciones generaron segmentos peptídicos muy similares en las tres fermentaciones realizadas. Al principio de las tres fermentaciones se encuentran fragmentos peptídicos con alto PM (de 13.6 a 9.3), los cuales van siendo degradados durante el transcurso de la fermentación sobre todo los fragmentos con mayor peso. Se aprecia que en las fermentaciones realizadas con el 20% este proceso es más rápido que las otras dos fermentaciones, ya que desde la hora 12 de fermentación los péptidos encontrados son menores a 8 kDa mientras que en las otras fermentaciones todavía se encuentran péptidos mayores los cuales son degradados entre los tiempos 32 y 48. En las tres

fermentaciones se encuentran similitudes en el peso molecular de los péptidos generados, algunas de éstas fracciones son potencialmente bioactivas.

Con respecto a la concentración de los péptidos encontrados por electroforesis que son generados durante el proceso de fermentación se observó que las fermentaciones realizadas con el 10% presentaron una concentración muy baja cuando se comparan con las otras dos fermentaciones realizadas, entre las otras dos fermentaciones no existe una gran diferencia pero se encontraron concentraciones un poco más elevadas en las fermentaciones realizadas con 20%, por lo que cualquiera de estos dos medios de fermentación pueden utilizarse para lograr un buen método de producción de este tipo de secuencias bioactivas..

Se observó que la producción de péptidos en las tres fermentaciones concuerda con lo propuesto por **Gasson y De Vos** en **1994**, los cuales proponen que la generación de péptidos de menor tamaño se debe a la proteólisis de segmentos peptídicos de mayor tamaño, los cuales a su vez son originados de la hidrólisis de segmentos peptídicos de mucho mayor tamaño o de las proteínas de la leche.

6.2.4. Comparación de los PM de los péptidos generados durante las fermentaciones con los PM de péptidos reportados como bioactivos

La hipótesis de este trabajo era determinar si *Lactococcus lactis* era capaz de generar secuencias peptídicas bioactivas a partir de la fermentación de las proteínas de la leche mediante el uso de su sistema proteolítico.

Con ayuda de la electroforesis, fue posible determinar en las tres fermentaciones realizadas (10, 15 y 20% de sólidos), secuencias peptídicas que oscilan entre 13.67 a 0.38 kDa. Los pesos moleculares de la gran mayoría de los péptidos reportados como bioactivos se encuentran entre 0.38 a 4.8 kDa, aunque se han reportado péptidos antimicrobianos cuyo peso molecular es más elevado que los 5 kDa, de hecho en la fermentación realizada con 15% de sólidos se encontró una secuencia peptídica que coincide con el PM (5.82 kDa) de un péptido antimicrobiano derivado de la lactoferrina (Dionysius & Milne, 1997).

Utilización del sistema proteolítico de Lactococcus lactis para la generación de péptidos potencialmente bioactivos

La coincidencia de los pesos moleculares de los péptidos obtenidos durante la fermentación con *Lactococcus lactis* con los reportados como bioactivos, nos indica que existe una gran posibilidad de que se hayan generado ciertas secuencias peptídicas bioactivas durante las fermentaciones. De esta manera, se compararon los pesos moleculares de las fracciones peptídicas obtenidas con los pesos moleculares de las secuencias de los péptidos reportados como bioactivos. Para esto se consideran como posibles equivalentes del péptido bioactivo en cuestión a péptidos que difieran del peso de éste en un rango aproximado de ± 55 Da para los péptidos mayores a 1kDa y de ± 20 Da para los péptidos menores a 1kDa, debido a que la determinación del PM del péptido por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS podría no detectar cambios tan pequeños en el PM. En la tabla 12 se reportan los péptidos encontrados por electroforesis generados durante las fermentaciones con *Lactococcus lactis*.

Tabla 12 Péptidos potencialmente bioactivos encontrados por electroforesis generados en las fermentaciones

Fermentación en donde se encontró	Peso Molecular encontrado con electroforesis (Da)	PM reportado (Da)	Posible secuencia	Posible bioactividad	IC ₅₀ (µg/mL)
15%	5821.90	5851	Lf f(1-48)	Antimicrobiano	
20%	4753.34	4807.04	α_{s2} -CN f(165-203)	Antimicrobiano	
20%	3973	3980	α_{s2} -CN f(1-32)	Inmunomodulador	
10%	3469.32	3470.01	β -CN f(1-28)	Inmunomodulador	
20%	3421.51				
20%	3128.07	3125	Lf f(17-41)	Inmunomodulador y antimicrobiano	
15%	3069.65	3114.55	β -CN f(1-25)	Acarreador de minerales, Inmunomodulador, Citomodulador	
15%	2759	2764.41	α_{s1} -CN f(1-23)	Inmunomodulador y Antimicrobiano	
20%	2693.87	2710.82	α_{s1} -CN f(59-79)	Acarreador de minerales	
10%	2625.73	2623.21	α_{s2} -CN f(127-147)	Acarreador de minerales	
20%	1997.90	2011.51	α_{s2} -CN f(164-174)	Antimicrobiano	
10%	1867.97	1881.37	β -CN f(193-209)	Inmunomodulador	
20%	1899.36				
10%	1702.31	1700.68	β -CN f(29-41)	Acarreador de minerales	
15%	1618.50	1590.79	β -CN f(12-23)	Antimicrobiano	
20%	1573.01				
15%	1454.74	1463.90	β -CN f(7-18)	Acarreador de	

Utilización del sistema proteolítico de Lactococcus lactis para la generación de péptidos potencialmente bioactivos

20%	1481.74			minerales	
10%	1249.11	1269.60	?-CN f(106-116)	Antitrombótico	
10%	1211.03	1217.50	β -CN f(60-70)	Opioide, Inmunomodulador	
		1200.47	α -LA f (105-110)	Antihipertensivo	745.2
15%	1175.24	1194.56	α_{s1} -CN f(66-74)	Acarreador de minerales	
		1157.41	β -CN f(193-202)	Inhibidor de la ACE, Inmunomodulador	347.22
15%	1001.0	1003.31	α_{s1} -CN f(102-109)	Antihipertensiva	
		1003.33	?-CN f(103-111)	Antitrombótica	
		1001.24	BSA f (208-216)	Inhibidor de la ACE	
10% 20%	975.10	979.24	α_{s2} -CN f(174-181)	Antihipertensivo	
15%	853.37	852.98	β -LG f(94-100)	Inhibidor de la ACE y Inmunomodulador	
		865.92	α_{s1} -CN f(157-164)	Antihipertensivo	84.86
10%	835.37	837.12	β -LG f(142-148)	Inhibidor de la ACE	
		830.00	β -CN f(177-183)	Inhibidor de la ACE, Citomodulador	35.7
10%	738.00	737.89	α_{s2} -CN f(174-179)	Inhibidor de la ACE	
20%	569.39	579.72	α_{s1} -CN f(23-27)	Inhibidor de la ACE	
		579.68	β -CN f(60-64)	Opioide, Inhibidor de la ACE	6.3
20%	374.70	392.52	β -LG f(81-83)	Inhibidor de la ACE	

Nota: IC₅₀: Es la concentración de péptido requerida para inhibir en un 50% la actividad de la enzima ACE, para los péptidos antihipertensivos; y en el caso de los péptidos opioides indica la cantidad de péptido requerida para lograr la inhibición a un ligando opioide en un 50%. Los valores de IC₅₀ reportados en la tabla fueron obtenidos de (FitzGerald & Meisel, 2000; Meisel & FitzGerald, 2000).

En la tabla 12 se puede observar que hay una gran cantidad de segmentos potencialmente bioactivos en las fermentaciones realizadas, encontrándose posibles secuencias bioactivas iguales en al menos dos fermentaciones realizadas con diferentes concentraciones de leche (3470.01, 1881.37, 1590.79, 1463.90 y 975.10). Lo anterior habla de la especificidad de las peptidasas de *Lactococcus lactis* de hidrolizar las proteínas de la leche en sitios muy específicos. Se encontraron secuencias peptídicas potencialmente bioactivas dentro del rango de 5.82 a 0.37 kDa. La gran mayoría de los péptidos encontrados

en las fermentaciones coinciden con el peso molecular de péptidos bioactivos que presentan una acción antihipertensiva, inmunomoduladora, antimicrobiana y ligadora de minerales pero también fueron encontrados en menor cantidad fragmentos peptídicos que coincidían con péptidos opioides, citomoduladores y antitrombóticos.

En los geles de electroforesis sobre todo en los de las fermentaciones realizadas con el 20% se aprecia una disminución en las algunas de las proteínas de la leche como la β -LG, α -LA, la κ -CN y muy posiblemente la α s1-CN; esta disminución es debida a la degradación de éstas por el sistema proteolítico. En estudios realizados por Flambard y colaboradores en 1994 se demostró que la degradación de la κ - y la β -CN era de suma importancia para la obtención de aminoácidos indispensables para *Lactococcus lactis* pudiera crecer en leche.

En la tabla anterior se aprecian péptidos reportados como bioactivos que coinciden con los valores de PM de las secuencias peptídicas encontradas en las fermentaciones que provienen de las proteínas antes mencionadas por lo que muy posiblemente si se encuentren estas secuencias en las fermentaciones.

Se comparó los valores de IC_{50} reportados para los péptidos antihipertensivos y opioides con las concentraciones de las fracciones peptídicas con ese PM obtenidas por electroforesis. En las fermentaciones realizadas con el 10% se encontraron dos secuencias peptídicas que podrían ser péptidos antihipertensivos; del primero de ellos (PM 1200.47 Da) se requieren 745.2 μ g/mL para lograr la inhibición de la ACE en un 50% y de otro péptido (PM 830 Da) se requieren 35.7 μ g/mL para lograr ese mismo efecto. La cantidad obtenida en las fermentaciones de éstos péptidos fue de 28.3 y 25.6 μ g/mL respectivamente, cantidades por debajo de valor de IC_{50} reportado.

Con respecto a las fermentaciones realizadas con el 15% de ST, se encontraron dos secuencias peptídicas que coinciden con el peso molecular de péptidos antihipertensivos, el primero de ellos tiene un PM de 1157.41 Da y el segundo con un PM de 865.92 Da., estos dos péptidos presentan los siguientes valores de IC_{50} 347.22 y 84.86 μ g/mL. La cantidad obtenida de estas secuencias en las realizadas con el 15% de sólidos de leche fue de 139.4 y 92.33 μ g/mL respectivamente, al realizar la comparación con los valores respectivos de IC_{50} se observa que la concentración obtenida es inferior que éste, pero la segunda cantidad es mayor al valor del IC_{50} correspondiente.

En las fermentaciones realizadas con el 20 % se encontró un péptido (PM 569.68 Da) que coincide con el PM de un péptido reportado como opioide, del cual se requieren 6.3

Utilización del sistema proteolítico de Lactococcus lactis para la generación de péptidos potencialmente bioactivos

µg/mL para inhibir en un 50% la unión a un ligando opioide y en la fermentación se obtuvo 196 mg/mL, cantidad muy por arriba del valor del IC₅₀ reportado.

Como se mencionó en los antecedentes, está bien documentado que los sistemas proteolíticos de las bacterias ácido lácticas son muy similares en sus componentes y mecanismo de acción (Savijoki, *et al.*, 2006; Kunji *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1993), por lo que algunos de los péptidos potencialmente bioactivos generados durante la fermentación de la leche con *Lactococcus lactis* podrían encontrarse en otros productos lácteos.

Se comparó el peso molecular de los péptidos obtenidos en las fermentaciones realizadas con los encontrados en yogures comerciales (Pérez, 2006), estos productos son fermentados con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. También se compararon con la leche fermentada LC1 la cual es elaborada con *Lactobacillus johnsonii* y *Streptococcus thermophilus* (González, 2004). Se encontraron algunas coincidencias las cuales se reportan en la tabla 13.

Tabla 13 Coincidencias de péptidos reportados como bioactivos en yogures y otros productos lácteos fermentados (González, 2004; Pérez, 2006)

Peso Molecular de los péptidos encontrados por electroforesis (kDa)						
Producto en donde se encontraron los péptidos						
Fermentación con <i>Lactococcus lactis</i>	Alpura	Yoplait	Lala	Nestlé	LC1	Danone
3469.32		3474				
2625.73	2604	2601		2643		
1997.90			2037			
1702.31		1721				
1618.50	1600	1602		1601		
1454.74	1450					1463
1249.11		1277			1259	
1175.24			1191			
1001.1	1001	1013		1014		
835.37	825	825				
579		581		567.75		
374.70		391				

En la tabla 13 se observó que 12 de los segmentos peptídicos potencialmente bioactivos generados en las fermentaciones realizadas han sido encontrados también en otros productos lácteos fermentados con otras BAL, lo que podría indicar que aunque existen diferencias en la especificidad de ciertas peptidasas y en sus sistemas de transporte, el

mecanismo mediante el cual degrada las proteínas de la leche sigue un mismo patrón (Savijoki *et al.*, 2006).

Se observa que en yogurt yoplait se encontraron 9 fragmentos peptídicos que presentan el mismo peso molecular que los generados por *Lactococcus lactis* en las fermentaciones.

7. Conclusiones

De acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

- Durante la fermentación de la leche con *Lactococcus lactis* se observó que hubo hidrólisis de las proteínas de la leche la cual fue determinada por el aumento en la concentración de grupos amino libres.
- Las fermentaciones con las tres concentraciones de sólidos de la leche probadas tuvieron tendencias similares aumentando desde el tiempo cero hasta llegar a un máximo entre las 28 y 32 horas.
- La concentración de sólidos tuvo un efecto en la concentración de grupos amino libres obteniéndose una mayor cantidad en las fermentaciones realizadas con el 20% de sólidos de leche.
- En términos de rendimiento (cantidad de grupos amino libres/cantidad de proteína en las fermentaciones) los mejores resultados se obtuvieron para la fermentación realizada con el 15% de sólidos.
- Durante el almacenamiento se observa una disminución en la concentración de grupos amino libres y aunque posteriormente se observa un incremento en ningún caso se alcanzan los niveles de acumulación obtenidos durante las fermentaciones.
- Mediante la técnica de electroforesis, se logró observar la generación de péptidos, menores a los 14.4 kDa, los péptidos encontrados en las fermentaciones se encuentran entre los 0.37 a 13.6 kDa.
- Se encontró una mayor diversidad de segmentos peptídicos menores a 14.4 kDa en las fermentaciones realizadas con el 20% de sólidos de leche.
- Se hallaron coincidencias en los PM de los péptidos generados con los encontrados en otros productos lácteos fermentados con otras BAL lo cual nos indica cierta similitud en la especificidad entre los diferentes sistemas proteolíticos de estas bacterias.

7.1. Recomendaciones

- a) Efectuar un aislamiento de las fracciones peptídicas potencialmente bioactivas generadas en las fermentaciones realizadas con *Lactococcus lactis* para poder secuenciar y verificar de que se trate de esa cadena polipeptídica, se pueden también llevar a cabo pruebas de bioactividad para determinar los IC₅₀ de cada una de ellas.
- b) Por los resultados obtenidos en este trabajo, se recomienda parar la fermentación entre los tiempos 28 y 32 horas para obtener una mayor cantidad de péptidos, y sea ésta una alternativa a los métodos de producción de secuencias peptídicas potencialmente bioactivas existentes (métodos con enzimas digestivas)
- c) Se podrían efectuar fermentaciones en donde se controle el pH para observar si se obtiene una mayor cantidad de péptidos que las realizadas sin control de pH. En estudios realizados por Le Blanc y colaboradores en 2002 se encontró que las leches fermentadas con *Lactobacillus helveticus* en donde se controlaba el pH el grado de proteólisis fue mas elevado que en aquellas en las que no se controla el pH.

8. Perspectivas

En este trabajo de investigación queda de manifiesto que las BAL, las cuales son utilizadas para la elaboración de productos lácteos fermentados, tienen la capacidad de producir péptidos que pueden tener alguna actividad biológica, sin embargo con los métodos hasta ahora utilizados no es posible asegurar que todos los fragmentos peptídicos generados por *Lactococcus lactis* presentarán alguna actividad biológica, es por ello que se tiene que hacer uso de otras tecnologías como las siguientes: i) identificación de péptidos ii) aislamiento iii) secuenciación iv) pruebas de funcionalidad.

Los resultados obtenidos hasta el momento nos indican que *Lactococcus lactis* tiene una gran potencialidad para generar secuencias peptídicas bioactivas y por lo que puede tratarse de un buen método de producción de éstas cadenas polipeptídicas (como alternativa de los métodos de producción de péptidos por hidrólisis enzimática).

Algunos de los retos más importantes que a los que se enfrentan los investigadores de ésta área son los siguientes (Korhonen *et al.*, 1998; Korhonen, 2002; Pihlanto, 2001):

- Desarrollo de mejores técnicas de separación (cromatográficas y de membrana) por las cuales las secuencias activas puedan ser separadas y enriquecidas.
- Estudios acerca de las propiedades que presentan estas fracciones activas.
- Desarrollo de nuevos alimentos que contengan fragmentos activos, en los cuales se retenga la actividad de estos por el mayor tiempo posible, ya que se sabe que los péptidos son más reactivos que las proteínas, debido a su bajo peso molecular, y por lo tanto los péptidos que están presentes en la matriz del alimento, pueden reaccionar con los otros componentes alimentarios, por esta razón deben de investigarse la influencia de las condiciones de proceso (principalmente el calentamiento) y la posible interacción de los péptidos bioactivos liberados con los carbohidratos y los lípidos presentes en el alimento sobre la actividad fisiológica que pueden ejercer en el organismo así como la biodisponibilidad del péptido biológicamente activo en el alimento.

*Utilización del sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* para la generación de péptidos potencialmente bioactivos*

- Realizar estudios acerca de la posible formación de compuestos tóxicos, alergénicos o cancerígenos como la acrilamida o las aminas biogénicas durante el proceso de obtención de péptidos bioactivos.
- Desarrollo de procesos a escala comercial que permitan producir una mayor cantidad de péptidos bioactivos en los cuales se utilice cepas bacterianas (bacterias lácticas) para la liberación de estos a partir materiales ricos en proteínas.
- Realizar más estudios moleculares acerca del mecanismo o mecanismos, por el cual los péptidos bioactivos ejercen su actividad o actividades.

9. Bibliografía

1. Adler, J., (1979) Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 27(6): 1256-1261
2. Agawa, Y., Lee, S., Ono, S., Aoyagi, H., Ohno, M., Tanoguchi, T., Anzai, K., Kirino, Y., (1991) Interaction with phospholipid bilayers: ion channel formation, and antimicrobial activity of basic amphipatic α -helical model peptides of various chain lengths. *Journal of Biology Chemistry* 296: 20218-20222
3. Aimutis, R., (2004) Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *The Journal of Nutrition*. Suppl. 989S-995S
4. Alais C.(1991) Ciencia de la leche. Principios de Técnica Lechera, edit. CECSA, México, D. F.
5. Batt, C., (1999) *Lactococcus*- Introduction. Enciclopedia of Food Microbiology. Ed. Academic Press. 1664-1166
6. Barefoot, S., & Nettles, C., (1993) Antibiosis revisited; bacteriocins produced by dairy starter cultures. *Journal of Dairy Science* 76(8): 2266-2379
7. Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Tomita, M.(1992) Identification of the bactericidal domain of lactoferrine. *Biochimica et Biophysica Acta* 1121:130-136
8. Beucher, S., Levenez, F., Yvon, M., Corring, T., (1994) Effects of gastric digestive products from casein on CCK release by intestinal cells in rats. *Journal of Nutrition and Biochemistry* 12: 578-584
9. Broadbent, J., & Steele, J.,(2005) Cheese flavor and the genomics of lactic acid bacteria. *ASM News* 71(3):121-128
10. Chabance, B., Marteau, P., Rambaud, C., Migliore-Samour, D., Boynard, M., Perrotin, P., Guillet, R., Jolles, P., Fiat, M., (1998) Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk and yogurt. *Biochimie* 80(2): 155-165
11. Chabance, B., Jolles, P., Izquierdo, C., Mazoyer, E., Francoual, C., Drouet, L., Fiat, M., (1995) Characterization of an antithrombotic peptide from κ -casein in new born plasma alter milk ingestion. *British Journal of Nutrition* 73(4):583-590
12. Chaplin, L., & Lyster, J. (1986) Irreversible heat denaturation of bovine α -lactalbumin. *Journal of Dairy Research* 53:249-258
13. Cheftel, J., Cuq, J., Lorient, D. (1989) Proteínas alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas, Acribia, España, pp 179-205
14. Clare, D., & Swaisgood, H., (2000) Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of Dairy Science* 8(6): 1187-1195
15. Courtney, P., (1999) *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and *cremoris*. Enciclopedia of Food Microbiology. Ed. Academic Press. 1166-1171
16. Creamer, L., Parry, D., Malcom, G., (1983) Secondary structure of bovine β Lactoglobulin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 227: 98-105
17. Dionysius, D., & Milne, J., (1997) Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization. *Journal of Dairy Science* 80: 667-664
18. Doeven, M., Kok, J., Poolman, B., (2005) Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Molecular Microbiology* 57(3): 640-649
19. Eddy, J., Smid, J., Poolman, B., (1991) Casein utilization by lactococci. *Applied & Environmental Microbiology* 9: 2447-2452
20. Fiat, M., Migliore-Samour, D., Jollès, P., Drouet, L., Bal dit Sollier, C., Caen, J., (1993). Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *Journal of Dairy Science*. 76, 301-310.
21. Fiat, M., Lévy -Toledano, S., Caen, P., Jollès, P. (1989). Biologically active peptides of casein and lactotransferrin implicated in platelet function. *Journal of Dairy Research*. 56, 351-355.

22. FitzGerald, R., & Murray, B., (2006) Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology* 59: 118-125
23. FitzGerald, R., & Meisel, H., (2000) Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I converting enzyme *British Journal of Nutrition* 84: S33-S37
24. Flambard, B., Helinck, S., Richard, J., Juillard, V., (1994) The contribution of caseins to the amino acid supply for *Lactococcus lactis* depends on the type of cell envelope proteinase. *Applied and Environmental Microbiology* 64(6):1991-1996
25. Forestier, C., & De Champs, C., (2001) Probiotic activities of *Lactococcus casei* spp *rhamnosus* *in vitro* adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Research in Microbiology* 152: 167-173
26. Fox, P., (2001) Milk proteins as food ingredients. *International Journal of Dairy Technology* 54: 41-55
27. Fox, P., & McSweeney, P. (1998) Cap 4. Dairy chemistry and Biochemistry, ed. Blackie Academic and Professional
28. Fox, P. (1992) Cap 2, 4 & 5, Advanced dairy chemistry vol.1 Proteins, editor Fox, P., ed, Elsevier Science Publishing Co., INC, Essex, U.K.
29. Fuller, R., (1989) Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66: 365-378
30. García, H., (2000) Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Laboratorios Beterá- UNIV DIAG.* 1(2): 31-41
31. Gasson, M., & De Vos, W., (1994) Cap 4: The proteolytic system of Lactic Acid Bacteria, genetics and biotechnology of Lactic Acid Bacteria, editor Gasson, M., de Vos., ed. Blackie Academic Profesional and Chapman Hall, 196-210
32. Gobbetti, M., Minervini, F., Rizzello, C., (2004) Angiotensin I converting-enzyme –inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology* 57(2): 173-188
33. Gobbetti, M., Stepaniak, De Angelis, Corsetti, A., (2002) Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Critical Reviews in Food Science* 42(3): 223-239
34. González, L., (2004) Liberación de péptidos bioactivos por bacterias lácticas [Tesis de maestría]. División de Ciencias Biológicas y de la Salud-UAM Iztapalapa. México, D.F., 5 de enero de 2004
35. Gill, S., Doull, F., Rutherford, J., Cross, L., (2000) Immunoregulatory peptides in bovine milk. *British Journal of Nutrition* 58 111–117.
36. Guarner, F., & Schaafsma, G., (1998) Probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 39: 237-238
37. Havenaar, R. & Huis in't Veld, J. 1992, Probiotics: a general view, In: Wood BJB (Ed). The lactic acid bacteria: voll The lactic Bacteria in health and disease. Elsevier Applied Science. 151-70
38. Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y., Takano, T., (1996) A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 64: 767-771
39. Hartmann, R., & Meisel, H., (2007) Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology* 18: 163-169
40. Homma, N., (1988) Bifidobacteria as resistance factor in human beings. *Bifidobacteria Microflora* 7: 35-43
41. Hurley, M., Larsen, L., Kelly, A., Mc Swenney, P., (2000) The milk acid proteinas e cathepsin D: a review. *International Dairy Journal* 10: 673-681
42. Jay, J., (2000) Fermentation and fermented dairy products. *Modern Food Microbiology* 6th edition. Aspen publication. USA. pp: 113-130
43. Jiménez, J., & García, M., (2006) Propiedades nutraceuticos de las proteínas del suero y sus fracciones. *Carnilac* 22-27
44. Juillard, V., Guillot, A., Le Bars, D., Gripon, J., (1998) Specificity of milk peptide utilization by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 64:1230-1236

45. Juillard, V., Furlan, S., Foucaud, C., Richard, J., (1996) Mixed cultures of proteinase-positive and proteinase-negative strains of *Lactococcus lactis* in milk. *Journal of Dairy Science* 79 : 964-970
46. Juillard, V. Le Bars, D. Kunji , E., (1995) Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Applied Environmental Microbiology* 61: 3024-3030
47. Kang, H., Lee, K., Kim, L., Hahm, S., (1996). Structure-biological activity relationship of 11-residue highly basic peptide segment of bovine lactoferrin. *International Journal of Peptide Research* 48: 357-363.
48. Kayser, H., & Meisel, H., (1996) Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from milk proteins. *FEBS Letters* 383: 18-20
49. Kimoto, H., Kurisaki, J., Tsuji, N., Ohmomo, S., Okamoto, T., (1999) Lactococci as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. *Letters in Applied Microbiology*. 29: 313-316
50. Kok, J., & De Vos, W., (1994) The proteolytic system of lactic acid bacteria in Gasson, M., De Vos, W., (eds) *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*. Backie Academic & Professional , Glasgow, U.K., pp. 169-210
51. Kok, J., (1990) Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 87: 15-42
52. Konings, W., Poolman, B., Driessen, A., (1989) Bioenergetics and solute transport in Lactococci. *Critical Reviews in Microbiology* 16 : 419-476
53. Korhonen, H., (2002) Technology options for new nutritional concepts. *International Journal of Dairy Technology* 55: 79-88
54. Korhonen, H., & Pihlanto, A., (2004) Milk protein-derived bioactive peptides-novel opportunities for health promotion. *IDF Bulletin* 363: 17-26
55. Korhonen, H., & Pihlanto, A., (2003a) Food-derived Bioactive Peptides – Opportunities for designing Future Foods. *Current Pharmaceutical Design* 9:1297-1308
56. Korhonen, H., & Pihlanto, A., (2003b) Bioactive peptides: new challenges and opportunities for the dairy industry. *Australian Journal of Dairy Technology* 58:129-134
57. Korhonen, H., & Pihlanto, A., (2003c) Bioactive peptides and proteins. *Advances in Food and Nutrition Research* 47: 175-276
58. Korhonen, H., & Pihlanto, A., (2001) Food -derived bioactive peptides –opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design* 9:1297-1308
59. Korhonen, H., Pihlanto, A., Rantamaki, P., Tupasela, T., (1998) Impact on processing on bioactive proteins and peptides. *Trends in Food Science & Technology* 9: 307-319
60. Kunji, E., Mierau, I., Poolman, B., Konings, W., Venema, G., Kok, J., (1996) The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70:187-227
61. Lankaputhra, W., & Shah, N., (1995) Survival of *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. In the presence of acid and bile salts. *Culture and Dairy Products. Journal* 30:2-7
62. Law, J., & Haandrikman, A., (1997) Proteolytic Enzymes of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 7: 1-11
63. LeBlanc, J. G., Matar, C., Valdéz, J., LeBlanc, J., Perdigon, G., (2002) Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science* 85: 2733-2742
64. Leporanta, K., (2001) Developing fermented milks into functional foods. *Innovations in Food Technology* 10: 46-47
65. Leroy, F. & Vuyst, L., (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* 15: 67-78
66. Lönnerdal, B., & Iyer, S., (1995) Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annual Reviews in Nutrition* 42: 1299-1317
67. Maier, H., *Métodos Modernos de Analisis de Alimentos Tomo II –Métodos Electroquímicos y Enzimaticos*. Ed. Acribia, Zaragoza, España, 1982. pp 83-87

68. Matar, C., Le Blanc, J., Martin, L., Perdígón, G., (2003) Biologically active peptides released in fermented functional milk: role and functions. Handbook of fermented functional foods CRC Press
69. McIntosh, G., Regester, G., Le-Leu, R., Royle, P., Smithers, G., (1995) Dairy proteins protect against dimethylhydrazine-induced intestinal tumors in rats. *Journal of Nutrition* 125: 809-816
70. Meisel, H., (2005) Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Current Medicinal Chemistry*. 12:1905-1919
71. Meisel, H., (2001) Bioactive peptides from milk proteins: a perspective for consumers and producers. *Australian Journal of Dairy Technology* 56: 83-92
72. Meisel, H., (1998) Overview on Milk Protein-derived Peptides. *International Dairy Science Journal* 8:363-373
73. Meisel, H., (1997) Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. *Livestock Production Science* 50: 125-138
74. Meisel, H. & Bockelmann, W., (1999) Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and tropho-functional properties. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 207-215
75. Meisel, H. & FitzGerald, R., (2003) Biofunctional peptides from Milk Proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design* 9:1289-1295
76. Meisel, H., & FitzGerald, R., (2000) Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *British Journal of Nutrition* 84: S27-S31
77. Meisel, H. & Schlimme, E. (1990) Milk proteins: precursors of bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology* 8:41-43
78. Migliore-Samour, D., Floc'h, F., Jollés, P., (1989) Biologically active peptides implicated in immunomodulation. *International Dairy Research* 56 : 357-362
79. Mizushima, S., Ohshige, K., Watanabe, J., Kimura, M., Kadowaki, T., Nakamura, Y., Tochikubo, O., Ueshima, H., (2004) Randomized controlled trial of sour milk on blood pressure in borderline hypertensive men. *American Journal of Hypertension* 17: 701-706
80. Nagaoka, S., Futamura, Y., Miwa, K., Awano, T., Yamauchi, Y., Tadashi, K., Kuwata, T., (2001) Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine beta-lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 281: 11-17
81. Naito, H., Kawakami, A., Inamura, T., (1972) In vivo formation of phosphopeptide with calcium-binding property in the small intestinal tract of the rat fed on casein. *Agricultural and Biological Chemistry* 36:409-415
82. Pagelow, I., & Werner, H., (1986) Immunomodulation by some oligopeptides. *Methods and Findings of Experimental Clinical Pharmacology* 8: 91-95
83. Özer, B., (1999) Natural Antimicrobial System /Lactoperoxidase Enciclopedia of Food Microbiology. Ed. Academic Press 1587-1591
84. Pagelow, I., & Werner, H., (1986) Immunomodulation by some dipeptides. *Methods and Findings of Experimental Clinical Pharmacology* 8: 91-95
85. Papiz, M., Sawyer, L., Eliopoulos, E., North, A., Findlay, J., Sivraprasadarao, R., Jones, T., Newcomer, M., Kraulis, (1986) The structure of Beta- Lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature* 324: 383-385
86. Pariza, M., (1997) Conjugated linoleic acid; a newly recognized nutrient. *IFT Annual Meeting Orlando FL, Abstract* 15-3
87. Pérez, E., Determinación de actividad proteolítica a través de la producción de péptidos en yogures comerciales [Tesis para la obtención del título de Lic. En Química de Alimentos] Escuela de Ciencias Químicas - Universidad La Salle, 12 de julio del 2006
88. Pérez, M., & Calvo, M., (1995) Interaction of β -lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as possible biological function for this protein: a review. *Journal of Dairy Science* 78: 978-988
89. Pihlanto, A., (2001) Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends in Food Science Technology*. 11: 347-356

89. Pritchard, G., & Coolbear, T., (1993) The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology reviews* 12: 179-206
90. Rokka, T., Syvaöja, E., Tuominen, J., & Korhonen, H. (1997) Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of Lactobacillus GG fermented UHT milk. *Milchwissenschaft* 52 (12) 675-677
91. Sanders, M., (1999) Probiotics. *Food Technology* 53: (11) 67-77
92. Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P., (2006) Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 394-406
93. Sasaki, M., Boukje, W., Paris, T., (1995) Immunological and electrophoretic study of the proteolytic enzymes from various *Lactococcus* and *Lactobacillus* strains. *Journal of Dairy Research* 62: 611-620
94. Schägger, H., & Von Jagow, G., (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate- polyacrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166:368-379
95. Schanbacher, F. Talhouk, R. & Murray, F., Gherman, L., (1998) Milk-Borne bioactive peptides. *International Dairy Science*. 8: 393-403
96. Schanbacher, F., Murray, F., Thorton, J., Morley, S., Lilleyman, J., Onwude, J., Currie, I., Crompton, A., Talhouk, R., (1997) Biology and origin of bioactive peptides in milk. *Livestock Production Science*. 50(1): 105-123
97. Schlimme, E., & Buchneim, W., (2002). La leche y sus componentes –propiedades químicas y físicas. Ed. Acribia Zaragoza, España pp 33-75
98. Schlimme, E., & Meisel H., (1995) Bioactive peptides derived from milk proteins: structural, physiological and analytical aspects. *Die Nahrung* 39: 1-20
99. Seppo, L., Jauhainen, T., Poussa, T., Korpela, R., (2003) A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 77: 326-330
100. Seppo, L., Kerojoki, O., Suomalainen, T., Korpela, R., (2002) The effect of *Lactobacillus helveticus*-LBK-16H-fermented milk on hypertension – a pilot study on humans. *Milchwissenschaft* 57: 124-127
101. Shah, N., (2001) Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food technology* 55(11): 46-53
102. Shah, N., (2000) Effects of milk- derived bioactives: an overview. *British Journal of Nutrition* Suppl.1 S3-S10
103. Silva, S., & Malcata X., (2005) Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal* 15:1-15
104. Sindayikengera, S., & Wenshui, X., (2005) Milk biologically active components as nutraceuticals: Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45:645-656
105. Smacchi, E., & Gobetti, M., (2000) Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology* 17: 129-141
106. Smid, E., Poolman, B., Konings, W., (1991) Casein utilization by Lactococci. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2447-2452
107. Steijns, J. (2001) Milk ingredients as nutraceuticals. *International Journal of Dairy Technology* 54: 81-88
108. Sugai, R., (1998) ACE inhibitors and functional foods. *IDF Bulletin* 336:17-20
109. Takano, T., (1998) Milk derived peptides and hypertension reduction. *International Dairy Journal* 8:375-381
110. Tan, P., Poolman, B., Konings, W., (1993) Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Research* 60: 269-285
111. Torres, M., Vallejo, B., González, B., (2005) Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 55(2):111-117.,
112. Tuomilehto, J., Lindstrom, J., Hyyrynen, J., Korpela, R., Karhunen, M., Mikkola, L., Jauhainen, T., Seppo, L., Nissinen, A., (2004) Effect of ingesting sour milk fermented using

- Lactobacillus helveticus* bacteria producing tripeptides on blood pressure in subjects with mild hypertension. *Journal of Human Hypertension* 18: 795-802
113. Vermeirssen, V., Van Camp, J., Verstraete, W., (2004) Bioavailability of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition* 92:357-366
114. Visser, S., (1993) Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavour. An overview. *Journal of Dairy Science* 76: 329-350
115. Visser, S., Exterkate, F., Slangen, C., De Veer G., (1986) Comparative study of action of cell wall proteinases from various strains of *Streptococcus cremoris* on bovine α_{s1} -, β -, and κ -casein. *Applied Microbiology and Biotechnology* 29: 61-66
116. Walzem, R., Dillard, C., German, J., (2002) Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: What we know and what we may overlooking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42(4): 353-373
117. Wong, C., Regester, G., Francis, G., Watson, D., (1996) Immunomodulatory activities of whey fractions in efferent prefemoral lymph of sheep. *Journal of Dairy Research* 63: 257- 267
118. Wong, C., & Watson, D., (1995) Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice. *Journal of Dairy Research* 62:359-368
119. Yamauchi, K., Tomita, M., Giehl, T., Ellison, R., (1993) Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrine peptide fragment. *Infection and Immunity* 61: 719-728

10. Apéndices

10.1. Abreviaturas y símbolos de los aminoácidos

Tabla A.1. Abreviaturas de tres y una letra para los aminoácidos

Aminoácido	Abreviatura de tres letras	Abreviatura de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Acido aspartico	Asp	D
Asn o Asp	Asx	B
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Acido glutámico	Glu	E
Gln o Glu	Glx	Z
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Fosfoserina	Ser (P)	S
Treonina	Thr	T
Fosfotreonina	Thr (P)	T (P)
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	Z

10.2. Preparación de soluciones

10.2.1. Soluciones para el método de TNBS

10.2.1.1. Solución de glicina 3.0 mM en 1% SDS para curva patrón

Pesar 22.5 mg de glicina, 1 g de SDS y agregarlo en 50 mL de agua desionizada, revolverlos bien y posteriormente aforar la solución a 100 mL

10.2.1.2. Buffer de fosfatos a pH 8.2

Pesar 0.2125 de NaH_2PO_4 y 0.2125g de Na_2HPO_4 y adicionarlos a 900 mL de agua desionizada, agregar Na_2HPO_4 hasta tener un pH de 8.2 ± 0.02 , aforar a un 1L.

10.2.1.3. Solución 0.1 % de TNBS

Esta solución depende de la cantidad de tubos a analizar debe prepararse al momento del uso, en la campana con guantes y con un matraz volumétrico forrado con aluminio. Agregar la cantidad necesaria de TNBS en el volumen correspondiente de buffer de fosfatos pH 8.2.

10.2.1.4. Solución de HCl 0.1 N

Agregar 8.170 mL de HCl, en la campana a 900 mL de agua desionizada, aforar a 1L

10.2.2. Soluciones para electroforesis

10.2.2.1. Electroforesis para péptidos

Nota: Toda el agua utilizada para las soluciones y durante todo el proceso de electroforesis, debe ser desionizada

10.2.2.2.1. Solución stock de acrilamida (49.5% T y 6% C)

Porcentaje de acrilamida	46.5%
Porcentaje de bisacrilamida	3.0%

10.2.2.2.2. Gel de separación (20% T , 6 % C)

Solución stock de acrilamida	3.23 mL
Solución amortiguadora de separación pH 8.45	4.76 mL
SDS al 10%	160 μL
Persulfato de amonio al 10%	35 μL
TEMED	5 μL

Nota: El persulfato y el TEMED deben de agregarse después de desgasificar por 15 minutos a la solución formada por los otros tres componentes, además de que el persulfato debe de ser preparado en el momento de su uso.

10.2.2.2.3. Gel de concentración (4% T, 6% C)

Solución stock de acrilamida	0.32 mL
Solución amortiguadora pH 8.45	3.68 mL
SDS al 10%	80 μL
Persulfato de amonio al 10%	50 μL
TEMED	5 μL

10.2.2.2.4. Solución amortiguadora de separación

Tris 3.0 M
SDS al 0.3%
Ajustar el pH a 8.45 con HCl

10.2.2.2.5. Solución amortiguadora de la muestra

Agua desionizada	2 mL
Solución amortiguadora pH 6.8 (tris-HCl 0.5 M)	1 mL
Glicerol	1.2 mL
SDS al 10%	0.5 mL
Azul de Comassie al 1%	100 µL

10.2.2.2.7. Preparación de los estándares

Estándar de amplio espectro o de polipéptidos	2 µL
Solución amortiguadora de la muestra	20 µL
β-Mercaptoetanol	1.5 µL
Solución amortiguadora de pH 6.8	20 µL

Se coloca en un vial y se hierven durante 5 minutos

10.2.2.2.6. Solución amortiguadora de corrida (1X)

Tris base 0.1 M
Tricina 0.1 M
SDS al 0.1%

Nota: El pH deberá ser aproximadamente de 8.25, de lo contrario será necesario ajustarlo con ácido o base según sea el caso.

10.3. Estándares utilizados para la electroforesis

10.3.1. Estándar de amplio rango (Broad Bio-Rad)

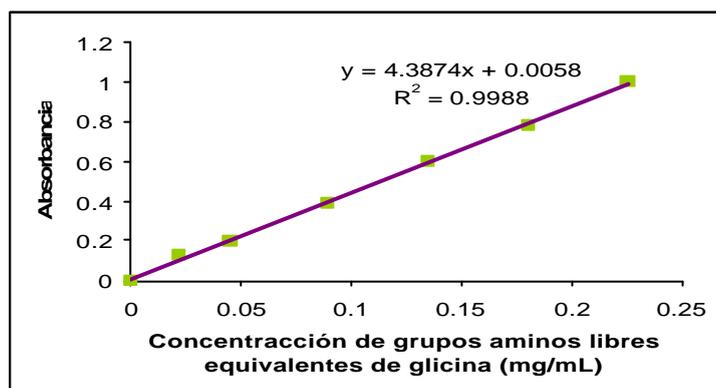
Proteína	Peso molecular (Da)
Miosina	200,000
?-galactosidasa	116,250
Fosforilasa b	97,400
Seroalbúmina	66,200
Ovoalbúmina	45,000
Anhidrasa carbónica	31,000
Inhibidor de tripsina	21,500
Lisozima	14,400
Aprotinina	6,500

10.3.2. Estándar de Polipéptidos (Polypeptide Bio-Rad)

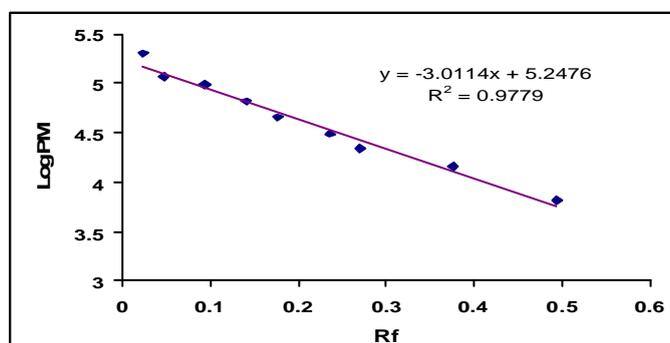
Proteína	Peso molecular (Da)
Triosafosfato isomerasa	26,625
Mioglobina	16,950
α -Lactoalbúmina	14,437
Aprotinina	6,517
Insulina b, oxidada	3,496
Bacitracina	1,423

10.4. Curvas patrón

10.4.1. Curva patrón del método de TNBS



10.4.2. Curva para la determinación de pesos moleculares por electroforesis



Iztapalapa, D. F., a 19 de diciembre de 2007

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

Utilización del sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* para la generación de péptidos potencialmente bioactivos.

Que presentó

I. A. Claudia Yuritzi Figueroa Hernández

Director:

M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz



Jurado:

Dra. Edith Ponce Alquicira (Presidente)



Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano (Secretario)



Dra. Judith Jiménez Guzmán (Vocal)



Dra. Carmen Wachter Rodarte (Vocal)

