



División de Ciencias Biológicas y de la Salud

SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS LIBERADOS POR BACTERIAS LÁCTICAS

Tesis que para obtener el grado de
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

M.B. Luis Guillermo González Olivares

Director:

Dr. J. Mariano García Garibay

Iztapalapa, D.F. a 2 de mayo de 2011.

Iztapalapa, D.F., a 2 de Mayo de 2011

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

SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS LIBERADOS POR BACTERIAS LÁCTICAS

Que presentó

M.B. Luis Guillermo González Olivares

Director

Dr. José Mariano García Garibay

Jurado

**Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero
(Presidenta)**

**Dra. Gabriela Mariana Rodríguez
Serrano (Secretario)**

Dra. Isabelle Gaimé Perraud (Vocal)

**Dra. Ivonne Figueroa González
(Vocal)**

*A veces podemos pasar años sin vivir en absoluto
y de pronto toda nuestra vida
se concentra en un solo instante...*

Oscar Wilde.

El trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Biotecnología Alimentaria de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa (UAM-I) bajo la dirección del Dr. J. Mariano García Garibay y la Dra. Judith Jiménez Guzmán, científicos titulares de este Departamento. Quiero agradecerles, tanto mi formación investigadora como el respaldo y el apoyo mostrados durante todo mi trabajo experimental.

Agradezco el infinito apoyo de la Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero, la Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano y a la M. C. Lorena Gómez Ruiz, Investigadores titulares del Departamento de Biotecnología Alimentaria, profesores sin los cuales hoy mismo no estaría escribiendo estas líneas.

Esta tesis está dedicada a Mis Padres que me hicieron una persona útil, humana y con una infinita capacidad de lucha, mil gracias por permitirme conocer a mis amados hermanos: Martha, Vicky, Paty, Gaby, Ana, Sabino, Jaime, Maurilio, Miguel, Balta, Mauricio y Flavio, ustedes a su vez han engendrado a seres maravillosos: Angie, Dado; Bicho, Dany, Luis, Arturo, Hugo, Alan, Balta, Karina, Jaime, Dianita, Alejandro, Fabián, Alexa, Paola, Javiercito, Evelyn, Jorge Armando y la más pequeña Fátima, la miguelita de la familia. A la Gran Pamela la primera bisnieta de la familia y al nuevo miembro de la familia que se esta cocinando, el segundo bisnieto. Ahora es que me doy cuenta de la fuerza increíble que somos todos juntos, quiero agradecerles la inyección de vida y esperanza.

Mi nueva familia, por que no se necesita ser hijo de sangre para saber que el cariño no tiene etiquetas, quiero agradecer su soporte Doña Carmen, Don Aarón, Aarón, Armando, Mimis, Gaby; José Luis y a los diablos Ximena, Lalo y Rodrigo. Gracias por haberme dado la posibilidad de vivir 11 años de la mayor felicidad con la persona que amo y respeto. Gracias Ale por haber hecho y seguir haciendo que mi vida tenga sentido, sin ti nada de esto hubiera sido posible, Te amo.

Mi mejor amigo, estas ahí cerca nunca te fuiste Pepe, aquí estamos juntos. Gerardo casi mi hermano, lo que te tengo que agradecer no se paga con toda la vida, te debo mucho. Chango he aprendido tantas cosas que ahora se que la vida me debía algo y me lo pagó contigo, en este trabajo esta impreso mi esfuerzo pero al mismo tiempo esta inscrita tu esencia.

Un agradecimiento especial a la Dra. Isabelle Gaimé Perraud y a la Dra. Ivonne Figueroa González por su apoyo y soporte a la revisión de este manuscrito y a los editores de la Revista Mexicana de Ingeniería Química por todo su apoyo para la publicación de mi artículo.

A mi Jefa la Lic. Lupita Sánchez, quiero agradecer todo su apoyo, mil gracias por creer en mi y por darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente.

Gracias Señor por todo tu consuelo y por haberme creado, sé que ahora tengo una misión en la vida y que la dirección que tome será la correcta siempre a la conducción de tu mano.

ÍNDICE

RESUMEN	I
SUMMARY	III
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Composición proteica de la leche.....	5
2.1.1. Caseínas.....	5
2.1.2. Proteínas de suero.....	7
2.2. Leches fermentadas.....	9
2.3. Péptidos bioactivos.....	12
2.3.1. Actividad opiácea.....	12
2.3.2. Actividad antitrombótica.....	14
2.3.3. Actividad inmunomodulatoria.....	15
2.3.4. Actividad antimicrobiana.....	16
2.3.5. Péptidos acarreadores de metales.....	17
2.3.6. Actividad antihipertensiva.....	17
2.3.7. Mecanismo de acción de la enzima convertidora de angiotensina.....	19
2.3.8. Péptidos derivados de las proteínas de leche inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) obtenidos por hidrólisis enzimática.....	21
2.3.9. Péptidos derivados de proteínas de leche inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) obtenidos por fermentación.....	22
2.3.10. Péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) en leches fermentadas.....	24
2.3.11. Efectos <i>in vivo</i> de los péptidos derivados de proteínas de leche inhibidores de la ACE.....	26
2.3.12. Otras actividades biológicas.....	28
2.4. Sistema proteolítico de bacterias lácticas <i>y de Streptococcus thermophilus</i>	29
2.4.1. Las proteinasas de las bacterias lácticas.....	30
2.4.2. Productos de degradación de proteínas.....	32
2.4.3. Sistema de transporte de aminoácidos y péptidos.....	33
2.4.4. Sistema de transporte de di- y tri-péptidos.....	34
2.4.5. Sistema de transporte de oligopéptidos.....	34
2.4.6. Peptidasas de bacterias ácido lácticas.....	35
2.4.7. Peptidasas de <i>S. thermophilus</i>	37
3. HIPÓTESIS, OBJETIVOS.....	39
3.1. Hipótesis.....	39
3.2. Objetivo general.....	39
3.3. Objetivos particulares.....	39
4. METODOLOGÍA	40
4.1. Plan de trabajo.....	40
4.2. Determinación de péptidos solubles. Método de Lowry	40
4.2.1. Preparación de las muestras.....	41
4.2.2. Procedimiento	41
4.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	42
4.3.1. Preparación de las muestras.....	42

4.3.2. Procedimiento.....	43
4.4. Separación de péptidos por electroforesis en gel de poliacrilamida TRICINA-SDS (Tricina-SDS-PAGE).....	45
4.4.1. Preparacion de las muestras.....	45
4.4.2. Procedimiento.....	46
4.5. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	48
4.5.1. Preparación de las muestras.....	48
4.5.2. Exclusión molecular (SEC-HPLC).....	49
4.6. Analisis estadístico.....	51
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
5.1. Determinación del contenido de péptidos solubles por el método de Lowry. 52	
5.2. Separación de proteínas de la leche fermentada por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	55
5.3. Separación de péptidos por electroforesis en gel de poliacrilamida Tricina-SDS (Tricina-SDS-PAGE).....	58
5.4. Análisis de concentración de proteínas y péptidos.....	60
5.5. Separación e identificación de péptidos por HPLC.....	67
5.5.1. Separación de péptidos.....	67
5.5.2. Identificación de péptidos.....	72
5.5.3. Relación de péptidos encontrados con péptidos conocidos.....	80
6. CONCLUSIONES.....	82
7. BIBLIOGRAFIA.....	84
Schmitt, C.; Bovag, C.; Vuilliomenet, A.M.; Rouvet, M.; Bovetto, L.; Barbar, R. y Sánchez, C. (2009). Multiscale characterization of individualized β -lactoglobulin microgels formed upon heat treatment under narrow pH range conditions. <i>Langmuir</i> , 25, 7899-7909.....	102
APENDICE 1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.....	107
A. Preparacion de soluciones para metodo de Lowry.....	107
B. Preparacion de soluciones para electroforesis para peptidos.....	107
B.1. Solución Stock de Acrilamida. (49.5% T, 6% C).....	107
B.2. Composición del gel de separación. (16.5% T, 6% C).....	107
B.3. Solución amortiguadora de separacion.....	107
B.4. Solución amortiguadora de la muestra.....	108
B.5. Solución amortiguadora de corrida (1X).....	108
C. Preparación de soluciones para electroforesis desnaturizante.....	108
C.1. Solución de acrilamida/bis-acrilamida solución madre (T = 30%, C = 2.67%).....	108
C.2. Solución reguladora tris-hcl 1.5 M, pH 8.8.....	108
C.3. Solución reguladora tris-hcl 0.05 M, pH 6.8.....	108
C.4. Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%.....	109
C.5. Solución de persulfato de amonio al 10%.....	109
C.6. Solución reguladora para la muestra.....	109
C.7. Solución reguladora de corrida tris-glicina-sds pH 8.3 (5X).....	109
C.8. Solución desteñidora ácido acético (7%)-metanol (10%).....	109
APENDICE 2. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE PATRONES DE PESO MOLECULAR.....	110

D.0. Curva patrón de sero-albúmina para el cálculo de concentraciones de péptidos solubles por la técnica de Lowry	110
D.1. Curva de calibración para el cálculo de pesos moleculares de péptidos. Patrón de pesos moleculares de amplio rango (Bio Rad).....	110
D.2. Curva de calibración para el cálculo de pesos moleculares de péptidos. Patrón de pesos moleculares para péptidos (Bio Rad).....	110
D.3. Curva de calibración para el cálculo de pesos moleculares de péptidos de HPLC en columna de exclusión molecular	111
D.4. Curva de calibración para el cálculo de concentraciones de péptidos de HPLC en columna de exclusión molecular	112

RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo la separación e identificación de péptidos con actividad biológica, principalmente péptidos con actividad antihipertensiva, en una leche fermentada comercial, con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus*, durante el almacenamiento refrigerado.

Esta tesis se ha estructurado en tres partes. En la primera parte se realizaron los análisis correspondientes a la determinación de péptidos solubles por la técnica de Lowry con la finalidad de: 1) determinar el efecto del tiempo de caducidad de la leche fermentada comercial, sobre la cantidad de péptidos solubles encontrados y 2) para estandarizar la cantidad de proteína para los análisis posteriores. Se pudo determinar que sin importar la fecha de elaboración de la leche fermentada, la concentración de péptidos, seguía un patrón de formación y acumulación, se observó una tendencia creciente de acumulación hasta el día 10, donde se alcanzó un máximo y se mantuvo constante hasta el final del estudio. Con los resultados obtenidos, se logró estandarizar la cantidad de proteína para los análisis posteriores.

En una segunda parte, se realizó un estudio de formación de péptidos por medio de electroforesis para péptidos, y una electroforesis desnaturizante SDS-PAGE. Esta última con la finalidad de determinar los cambios de concentración de proteínas de la leche durante el almacenamiento, principalmente, α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y caseínas. Durante el análisis de concentración en el gel de electroforesis, se observó una disminución constante en la concentración de caseínas que pasó de 5.2 a 1.8 mg/mL, mientras que en las proteínas del suero, se presentaron disminuciones de 0.4 a 0.2 mg/mL en α -lactoalbúmina y de 1.6 a 0.4 mg/mL en β -lactoglobulina. Estos resultados mostraron que la formación de péptidos es originada a partir de caseínas, mientras que la β -lactoglobulina es la proteína del suero que se degrada en mayor proporción. Por otro lado se determinó que hubo una formación y acumulación constante de péptidos hasta el día 7, posteriormente presento un aumento al final

del almacenamiento refrigerado. Estos resultados soportan los resultados obtenidos en el análisis de péptidos solubles en la primera etapa del estudio

En la tercera parte de esta tesis doctoral se realizó el análisis de las fracciones peptídicas, por medio de HPLC por exclusión molecular. Por medio de la aplicación de esta técnica se analizó la concentración y el peso molecular de los péptidos separados. Se encontró que el patrón de comportamiento fue similar al de electroforesis, formación y acumulación de péptidos hasta el día 7, manteniéndose constante hasta el día 11 y mostró un aumento hacia el final de la evaluación. Se lograron separar entre 10 y 12 fracciones peptídicas, entre las que se localizaron las de peso molecular menor a 2 kDa (1.4 y 0.87), que corresponde a pesos moleculares de péptidos bioactivos reportados. Por otro lado, las determinaciones de estas fracciones peptídicas se realizaron a longitudes de onda donde absorben los aminoácidos aromáticos, información relevante ya que estos aminoácidos están presentes en péptidos con actividad antihipertensiva. Se encontraron cuatro fracciones peptídicas con estas características, de las cuales tres coinciden en peso molecular con el peso molecular de péptidos reportados con actividad antihipertensiva.

SUMMARY

In this thesis peptides with biological activity have been separated and identified, mainly peptides with antihypertensive activity in commercial fermented milk with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus*, during refrigerated storage. This thesis is structured in three parts.

In the first part analysis of soluble peptides determination by Lowry technique was made, this in order to 1) determine the effect of time lapse of commercial fermented milk on the amount of soluble peptides found and 2) to standardize the amount of protein for further analysis. It was determined that no matter the time of preparation of fermented milk, the concentration of peptides followed a pattern of accumulation and formation, there was a growing trend of accumulation until day 10, which reached a maximum and remained constant until the end of the study. With these results, it was possible to standardize the amount of protein for further analysis.

In a second part, the formation of peptides by special electrophoresis for peptides and denaturing electrophoresis were performed. In the denaturing electrophoresis the changes in protein concentration of milk, mainly α -lactalbumin β -lactoglobulin and casein were showed. During the concentration analysis a decline concentration of casein was observed, which went from 5.2 to 1.84 mg / mL, whereas in the serum proteins, showed decreases of 0.4 to 0.2 mg / mL in α -lactalbumin and 1.6 to 0.4 mg / mL in β -lactoglobulin. These results showed that peptides were formed principally of caseins, while lactoglobulin is the main whey protein in the formation of peptide fractions after fermentation. On the other hand it was determined that there was a steady accumulation and formation of peptides until day 7 where it remained constant and it was increased at the end of refrigerated storage. These results support the results of the analysis of soluble peptides in the first part of the study.

In the third part of this thesis was the analysis of peptide fractions, using molecular exclusion HPLC. In this analyzed the concentration and molecular weight of the separated peptides were analyzed. It was found that the pattern of behavior was similar to that of electrophoresis, peptide accumulation until day 7, remaining constant until day 11 and an increase towards the end of the evaluation was observed. Separation was achieved between 10 and 12 peptides, which were located molecular weight peptides of less than 2 kDa (1.4 and 0.87), corresponding to a molecular weight of bioactive peptides reported. On the other hand detections of aromatic amino acids in the peptide fractions separated were made, since these amino acids are associated with peptides with antihypertensive and 4 peptides with a positive response to this study were found, of which three matches were found in molecular weight with some reported as antihypertensive peptides.

LISTA DE ABREVIATURAS

%C	Concentración de Bisacrilamida
%T	Suma de la Concentración de Acrilamida más Bisacrilamida
ACE	Enzima Convertidora de Angiotensina
ACN	Alfa Caseína
ALA	Alfa Lactoalbúmina
AS1CN	Alfa S ₁ Caseína
AS2CN	Alfa S ₂ Caseína
BCN	Beta Caseína
BLG	Beta Lactoglobulina
BSA	Sero Albumina Bovina
CMP	Caseinomacropéptido
C-TERMINAL	Carboxilo Terminal
ECA	Enzima Convertidora de Endotelina
f(X-Y)	Fracción Peptídica de una Proteína, Donde X representa la posición del primer aminoácido y la Y la posición del último, en la cadena
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
IC ₅₀	Concentración necesaria de un Compuesto para Inhibir el 50% de Actividad de la Enzima Convertidora de Angiotensina
IEC-HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución por Intercambio Iónico
Ig	Inmunoglobulina
KCN	Kappa Caseína
kDa	Medida de peso, equivalente a 1 g/mol
LF	Lactoferrina
NALOXONA	Fármaco antagonista de receptores opioides
NATRIURETICO	Sustancia que aumenta la excreción de sodio por vía urinaria
N-TERMINAL	Amino Terminal
Rf	Tiempo de retención, que es la distancia recorrida por la proteína entre la resta del límite inicial menos el límite final del frente de corrida
RP-HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en Fase Reversa
SEC-HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en Exclusión Molecular
SUSTANCIA P	Neuropéptido de cadena corta, que es un potente vasodilatador
TEMED	Tetra -metil-etil-N-di-amina

Los diferentes aminoácidos se nombraron con el código de tres letras cuando aparecían de manera individual y con el código de una letra cuando se encontraban en el interior de una secuencia peptídica.

1. INTRODUCCIÓN

Los “alimentos funcionales” se definen según el International Life Science Institute (ILSI) como aquellos alimentos que aportan efectos beneficiosos sobre una o más funciones fisiológicas, más allá de los efectos nutricionales, y que van encaminados a mejorar el estado de salud y bienestar o a reducir el riesgo de trastornos en el organismo (Diplock y col., 1998). Según el proyecto FUFOSSE (Functional Food Science in Europe), un “alimento funcional” debe cumplir ciertos requisitos. En primer lugar, debe ser consumido habitual o diariamente como parte de la dieta normal. Debe estar constituido por ingredientes naturales no presentes en el alimento original o en mayor concentración a la existente en dicho alimento. Sus efectos beneficiosos deben demostrarse científicamente y deben ser distintos a los meramente nutritivos. Además, deben mejorar el estado de salud del individuo, su calidad de vida y/o disminuir el riesgo de ciertas patologías. Finalmente, sus efectos deben estar autorizados. La obtención de alimentos funcionales puede llevarse a cabo por la adición de probióticos, prebióticos, simbióticos o ingredientes funcionales. Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se ingieren en cantidades suficientes, ejercen efectos positivos en la salud, adicionales a los meramente nutricionales (Vinderola y col., 2002). Se incluyen los efectos beneficiosos de estos microorganismos sobre el hospedador, mejorando su balance microbiano intestinal (Gorbach, 2000). El crecimiento de los microorganismos del tracto gastrointestinal puede promoverse también por los prebióticos, generalmente de naturaleza oligosacáridica, no digeribles pero fermentables por distintas especies de bacterias lácticas (Roberfroid, 2000). La combinación de los probióticos y prebióticos, denominada simbióticos, mejora la supervivencia de los primeros, además de producir una mayor colonización de la microflora colónica (Roberfroid, 2000). Los péptidos bioactivos se incluyen en el grupo de ingredientes funcionales de naturaleza proteica, que permiten la obtención de alimentos funcionales. La liberación de los péptidos bioactivos a partir de una secuencia proteica puede producirse por hidrólisis enzimática (Abubakar y col., 1998; Pihlanto-Leppälä y col., 2000; Hartmann y Meisel, 2007),

por procesos fermentativos (Yamamoto y Takano, 1999; Gobbetti y col., 2000; Quirós y col., 2006) o por la combinación de ambos procesos, que tiene lugar bien durante el procesado de alimentos o durante la digestión gastrointestinal (Saito, 2008). El empleo de microorganismos modificados genéticamente que expresan la secuencia peptídica bioactiva está abriendo un nuevo campo en la obtención de péptidos con actividades biológicas (Stanton y col., 2005). 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 los países industrializados por la hipertensión y/o por sus complicaciones renales, cardíacas o cerebrales.

Durante décadas las leches fermentadas se han considerado productos benéficos para la salud, esto se ha atribuido a los microorganismos involucrados en la fermentación. Estudios recientes han comprobado que estos beneficios también se deben a los diferentes productos liberados durante el proceso de fermentación, tales como metabolitos y otras moléculas biológicamente activas (Leroy y De Vuyst, 2004; Figueroa-González y col., 2010). A partir de leches fermentadas se han aislado numerosos péptidos con diversas actividades biológicas. El primer reporte de una leche fermentada, con actividad antihipertensiva comprobada, fue producida con una combinación de *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae*; ésta contenía dos tripéptidos inhibidores de enzima convertidora de angiotensina (Contreras y col., 2009). Y con este hecho se han comenzado a comercializar algunos alimentos con propiedades antihipertensivas. En Japón, se comercializa un “Food for Special Health Uses” o FOSHU, que contiene el dodecapéptido f(23-34) derivado de la α s1-caseína. Se ha demostrado su acción preventiva de la hipertensión y de los trastornos del sistema circulatorio (Saito, 2007). Además, con esta misma actividad han comenzado a comercializarse distintos productos lácteos fermentados. En Japón, la leche fermentada Calpis® (Takano, 1998), elaborada con *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae* y en Finlandia, la leche fermentada Evolus® (Leporanta, 2001; Stanton y col., 2005), elaborada con *Lactobacillus*

helveticus, reducen la presión sanguínea en pacientes hipertensos tras la acción inhibitoria de la ACE de los tri-péptidos VPP e IPP. Ambas leches fermentadas ya se comercializan como alimentos funcionales preventivos de la hipertensión en los países de origen. Además de utilizar los péptidos bioactivos como ingredientes en la elaboración de alimentos funcionales, dichos péptidos pueden formar parte de preparaciones farmacéuticas, aplicadas en la prevención y el tratamiento de distintos trastornos del organismo. Así, los caseinofosfopéptidos se están aplicando por su efecto recalcificante dental en el tratamiento de la caries (Meisel y Fitzgerald, 2003) y en procesos de mala absorción de minerales. Igualmente, los inmunopéptidos derivados de la κ -CN y de la ALA se están empleando en el tratamiento de síndromes de inmunodeficiencia, como el SIDA (Smacchi y Gobetti 2000; Berkhout y col., 2004). Se ha reportado en varios estudios la existencia de péptidos bioactivos en diferentes leches fermentadas: péptidos moduladores de la motilidad intestinal en una leche fermentada con *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus*; péptidos antihipertensivos en yogurt y kéfir (Korhonen, 2009). En este mismo contexto se ha demostrado que diferentes bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*) son capaces de producir péptidos bioactivos durante el proceso de fermentación y durante el almacenamiento en refrigeración (Phelan y col., 2009). Debido al poco tiempo de fermentación en la elaboración de leches fermentadas (2 a 4 horas), se lleva a cabo una capacidad proteolítica baja, que corresponde al 1 al 2% de las proteínas presentes, de la cual el 80% se lleva a cabo sobre caseínas (Meisel y Bockelmann, 1999). Sin embargo después de que finaliza la etapa de fermentación, la actividad proteolítica continúa, generando degradación de proteínas y péptidos liberados durante esta etapa, aún en refrigeración (Nielsen y col., 2009). Vinderola y col. (2002) determinaron, que aún cuando la temperatura óptima de proteinasas, peptidasas y aminopeptidasas pertenecientes al sistema proteolítico de bacterias lácticas, oscila entre 35 y 37°C, la actividad de estas no se pierde aún en refrigeración a 4°C. La generación de péptidos durante la refrigeración, tiene su origen de enzimas asociadas a bacterias vivas en el medio o a enzimas liberadas después de lisis celular (Nighswonger y col., 1996). Muchos estudios han comprobado la viabilidad

de bacterias probióticas en leches fermentadas comerciales almacenadas en refrigeración, enfocados a la mejora de cepas y técnicas de conservación (Shah y col., 1995; Vinderola y col., 2000; Shin y col., 2000; Adhikari y col., 2000), sin embargo los estudios de producción de péptidos durante el almacenamiento frío se reducen a la comparación de perfiles proteolíticos al inicio de la refrigeración y al final de esta (Nielsen y col., 2009). Algunos otros estudios se han centrado en una combinación de la medición indirecta de la actividad microbiana de bacterias de yogurt, por medio de la comparación de perfiles proteolíticos, durante almacenamiento a 4°C (Donkor y col., 2007a) relacionando estos cambios con los cambios de pH de la leche fermentada. Al mismo tiempo se ha comprobado que después de 28 días de refrigeración a 4°C, la actividad antihipertensiva de yogurt aumenta al final de este tiempo hasta en un 50%, calculado a partir del IC₅₀ (Donkor y col., 2007b), sin embargo en un estudio paralelo se comprobó que esta actividad antihipertensiva tiene su mayor aumento entre las semanas 1 y 3, que pasó de un IC₅₀ de 103.30 a 27 µg/mL (Donkor y col., 2007c). Por otro lado, se ha comprobado que hay un aumento en la concentración de péptidos en leches fermentadas comerciales, en los primeros 10 días de almacenamiento en frío a 4°C, manteniéndose constante hasta el final del estudio (15 días), los péptidos obtenidos fueron de tamaños variables y se comprobó que esta diversificación estaba determinada tanto por la especie de microorganismo con que estaba elaborada la leche comercial como de la concentración inicial de proteína en la leche fermentada (González-Olivares, 2004). Sin embargo son necesarios estudios más profundos sobre la diversificación de péptidos en procesos de almacenamiento refrigerado en leches fermentadas, que al mismo tiempo determinen su potencial nutricional y farmacéutico.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Composición proteica de la leche.

La leche está compuesta principalmente por agua, carbohidratos, lípidos y proteínas, así como otros constituyentes minoritarios como enzimas, vitaminas y sales minerales. Las proteínas se encuentran en una proporción de 30-35 g/L, constituyendo la fracción más compleja de la leche. Existen dos tipos de proteínas lácteas, las proteínas del suero y las caseínas, que representan el 80% del total. Estos dos tipos de proteínas se separan por precipitación isoelectrica, acidificando la leche cruda de vaca y a 20°C hasta pH 4.6 (Whitney, 1988; Fox y McSweeney, 2003).

La concentración proteica total, así como la concentración y la secuencia aminoacídica de cada una de las proteínas lácteas depende de la especie. El porcentaje de homología entre las proteínas de vaca/oveja o de vaca/cabra es del 95% y asciende hasta el 98% entre las proteínas de cabra y oveja. Además dentro de cada especie animal existen diferencias en función de factores genéticos, fisiológicos y nutricionales (Storry y col., 1983; Fox y McSweeney, 2003).

2.1.1. Caseínas.

Las caseínas es el grupo de proteínas que precipitan a pH 4,6 y 20°C (Whitney, 1988; Fox y McSweeney, 2003). Representan el 80% de las proteínas en la leche de vaca y oveja y el 72% en leche de cabra.

Bajo la denominación de caseínas se incluyen cuatro tipos de cadenas polipeptídicas, α_{s1} -caseína (AS1CN), α_{s2} -caseína (AS2CN), β -caseína (BCN) y κ -caseína (KCN). Las secuencias de sus estructuras primarias son complejas y muy diferentes a las de otras proteínas alimenticias, debido al alto contenido de prolina y a las regiones ácidas que incluyen los residuos de fosfoserina (Creamer y McGibbon, 1996). La conformación secundaria de las caseínas está poco

organizada (α -hélice y lámina β -plegada de longitudes cortas), similar a la estructura de las proteínas globulares desnaturalizadas (Fox y McSweeney, 2003). Debido a su diferente distribución de las cargas y a su hidrofobicidad, las caseínas se unen entre sí formando unas unidades o agregados coloidales denominados micelas, compuestos por un 92% de proteína y un 8% de sales inorgánicas, principalmente fosfato cálcico.

Las variantes genéticas conocidas de la AS1CN se diferencian entre si en el grado de fosforilación, comprendido entre 8 y 9 y en la sustitución de hasta 7 aminoácidos de los 199 que componen su estructura primaria. Se pueden distinguir tres zonas claramente hidrofóbicas, f(1-44), f(90-113), f(132-199) y un dominio de alta polaridad situado en el segmento f(41-80), en el que se encuentra la mayor parte de la carga de la proteína (Swaisgood, 1992; Wong y col., 1996; Treweek y col., 2011).

La α_{s2} -**caseína** (ACN), compuesta por 209 aminoácidos, es la proteína más hidrofílica del grupo de las caseínas. Puede tener entre 10 y 13 grupos fosfato distribuidos a lo largo de su cadena. Es una proteína caracterizada por tener diferentes dominios con altas cargas netas, lo que le hace fuertemente sensible a la acción del calcio y de otros cationes (Fox y McSweeney, 2003).

La β -**caseína**, compuesta por 209 aminoácidos, tiene entre 4 y 5 residuos de fosfoserina situados en el extremo N-terminal y presenta un fuerte carácter hidrofóbico en la mitad del extremo C-terminal f(136-209). Esta separación de la molécula en dos dominios de diferente hidrofobicidad hace que esta proteína sea altamente anfipática (Swaisgood, 1992; Yasar y col., 2006).

La κ -**caseína** es la proteína más diferente dentro del grupo de las caseínas, presenta Cys en su estructura primaria (Creamer y MacGibbon, 1996; Fox y Sweeney, 2003). Tiene 169 aminoácidos y hasta 5 cadenas glicosídicas unidas a los residuos de treonina o serina. Se dividen dos dominios claramente

diferenciados, el segmento N-terminal hidrofóbico y con carga neta positiva y el extremo C-terminal, de carácter hidrofílico. En su estado nativo se encuentra como polímero debido a la formación de puentes disulfuro entre los grupos sulfhidrilo (Brody, 2000).

Durante la elaboración del queso, la acción hidrolítica de las enzimas presentes en el cuajo sobre el enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la KCN, localizada en la superficie de las micelas, da lugar a la para- κ -caseína, fragmento f(1-105), que queda retenida en la cuajada con el resto de las caseínas y el caseinomacropéptido (CMP), fragmento f(106-169), que permanece en el suero. La hidrólisis de la KCN provoca la desestabilización de las micelas y la consecuente coagulación de la leche (Brody, 2000).

2.1.2. Proteínas de suero.

Las proteínas de suero o proteínas solubles son de proteínas que permanecen en la fase líquida tras la precipitación de las caseínas a pH 4,6 y 20°C (Fox y McSweeney, 2003). Algunos péptidos de bajo peso molecular procedentes de la hidrólisis de las caseínas, también se incluyen en este grupo por ser solubles bajo las mismas condiciones.

β -lactoglobulina. Es la proteína mayoritaria en el suero de la leche de los rumiantes. Representa alrededor del 60% del total de las proteínas del suero de vaca (Law y col., 1993), con una variación de la concentración entre 2.3 y 4.9 g/L. en leche de cabra la concentración se encuentra entre 1.8 y 2.8 g/L. En la leche de oveja esta cantidad varía entre 2.7 y 5.0 g/L (Fox y McSweeney, 2003). Cabe señalar que esta proteína no está presente en la leche humana. La BLG bovina esta constituida por una cadena de 162 aminoácidos, de peso molecular aproximado de 18000 Da. Contiene cinco cisteínas, cuatro de las cuales están implicadas en la formación de puentes de disulfuro (Cys₆₆₋₁₆₀ y Cys₁₀₆₋₁₁₉) y una (Cys₁₂₁) aparece como grupo tiol libre (Godovac-Zimmermann y Braunitzer, 1987).

La estructura secundaria de esta proteína presenta una estructura en forma de α -hélice en un 15%, que se estabiliza por la formación de enlaces hidrofóbicos entre los residuos no polares y las lisinas, una estructura de lámina β en un 50% y una forma reversa en un 15-20% (Creamer y MacGibbon, 1996). La BLG presenta estructura globular, con una distribución más o menos uniforme de las secuencias polares y no polares. Debido a esta estructura, se producen interacciones intramoleculares que provocan la formación de puentes de disulfuro, quedando las zonas hidrofóbicas hacia el interior y el exterior aparece con un marcado carácter hidrófilo. A un valor de pH entre 5 y 7, la BLG se encuentra como dímero, formado por la unión covalente de dos monómeros (Pérez y Calvo, 1995; Bello y col., 2008). Si el pH es inferior a 3.5 o superior a 7.5 se disocia en monómeros, debido a repulsiones electrostáticas entre sus unidades, mientras que a pH entre 3.5 y 5.2 la BLG forma reversiblemente tetrámeros y octámeros (Uhrínova y col., 2000)

La ausencia de fosfato, el bajo contenido en prolina y la presencia de cisteína, cistina y metionina, hacen que la BLG sea poco estable frente a agentes desnaturizantes, como el calor, los álcalis, los compuestos orgánicos y los metales pesados. La acción de la temperatura sobre esta proteína provoca la disociación del dímero a monómero, la posterior desnaturalización del monómero con la exposición de los grupos sulfhidrilo y al formación de agregados (Caligant y col., 1991) este proceso será o no reversible en función de la intensidad y la duración del tratamiento a pH específico (Schmitt y col., 2009)

α -lactoalbúmina. La ALA representa el 25% de las proteínas del suero. En la leche de vaca, la concentración varía entre 0.8 y 1.2 g/L, entre 0.6 y 1.1 g/L en la leche de cabra y entre 1.2 y 2.6 en leche de oveja. La ALA bovina es una proteína globular de peso molecular aproximado de 14400 Da. Está constituida por 123 aminoácidos y cuatro enlaces disulfuro, sin ningún grupo tiol libre. Presenta tres variantes genéticas A, B y C, siendo la variante B la más común. (Fox y McSweeney, 2003). Presenta una configuración estable a valores de pH entre 5.4

y 9 presenta mayor resistencia al calor que la BLG, debido en parte a que la desnaturalización es reversible si la temperatura es inferior a los 75°C (Wijesinha-Bettoni y col., 2007). Se ha comprobado que liga fuertemente dos átomos de calcio y que la eliminación de este catión del medio provoca un cambio conformacional de la proteína (Hiraoka y col., 1980; Permyakov y col., 1981; Murakami y col., 1982) aunado al aumento de los enlaces disulfuro debido al incremento de la sensibilidad a agentes desnaturalizantes, como el calor, los productos químicos y el pH (Law y Leaver, 2000).

2.2. Leches fermentadas.

La fermentación de la leche para la elaboración de diferentes productos es una práctica muy antigua, la cual se originó sin intención durante el almacenamiento del alimento líquido. Durante estas fermentaciones se acumulan metabolitos como el ácido láctico, el etanol y muchos otros que conservan a la leche y le imparten características organolépticas distintas (García-Garibay y col., 1993).

La investigación sobre leches fermentadas ha crecido dramáticamente en los últimos veinte años. Las leches fermentadas tienen efectos probióticos debido a que su consumo lleva a la ingestión de grandes cantidades de bacterias vivas que ejercen beneficios en la salud, que va más allá de la nutrición básica. En los últimos veinte años, la investigación científica ha florecido, poniendo interés en los temas que van desde los efectos antimicrobianos hasta la reducción del riesgo de cáncer. De acuerdo a muchas investigaciones sobre leches fermentadas, el beneficio más comprobado sobre la salud (Suárez y Savaiano, 1997), es el hecho de que los individuos con deficiencia de lactasa digieren mejor la lactosa a partir de leche fermentada que de leche fresca. Este efecto se relaciona con las bacterias vivas, con su contenido enzimático (por ejemplo con la β -galactosidasa) y con la textura del producto.

Algunas leches fermentadas reducen la duración de ciertos tipos de diarreas, especialmente en niños (Meisel y Mcsweeney, 2003). De igual forma se ha demostrado el mejoramiento de ciertos parámetros del sistema inmunológico en modelos in vitro (Lemmonier y Solís-Pereira, 1991; Meisel, 2004). En un estudio en humanos se encontró un mejoramiento en los síntomas clínicos de la alergia nasal (Trapp y col., 1993). Estudios han demostrado que el consumo de bacterias del yogurt derivó en el incremento de linfocitos B y de las células asesinas (De Simone y col., 1993). Además se ha observado que péptidos derivados de fermentación de leche pueden actuar como inmunomodulantes debido a su afinidad por los receptores opiáceos presentes en las células T y en los leucocitos fagocíticos humanos (Clare y Swaisgood, 2000).

Un estudio epidemiológico francés, mostró que las personas que consumen leches fermentadas tienen un riesgo menor para desarrollar grandes adenomas colorectales (Boutron y col., 1996). Además el consumo de yogurt en sujetos de edad avanzada con gastritis atrófica condujo a la reducción de la nitroreductasa y la azoreductasa, enzimas fecales procarcinógenas (Pedrosa y col., 1995).

Se ha observado que la κ -CN de la leche tratada enzimáticamente con *Lactobacillus GG*, seguido de una digestión con tripsina y pepsina, da como resultado un péptido que aumenta la respuesta mitogénica de linfocitos humanos, cuando fue incluido en cultivo de células in vitro. En investigaciones posteriores se demostró que, los péptidos producidos por *Lactobacillus GG* en el intestino tenían la capacidad de favorecer la proliferación de linfocitos (Meisel, 2004).

Del mismo modo, en la producción de leche fermentada con esta misma cepa, se encontró la producción de péptidos opioides derivados de la hidrólisis de tripsina y pepsina. Es importante destacar que los productos de leche fermentados por bacterias lácticas, generan una cantidad importante de péptidos que además se conservan durante el proceso digestivo (Meisel y Fitzgerald, 2000; Hartmann y Meisel, 2007).

En otro estudio (leche UHT fermentada con *Lactobacillus casei* spp *rhamnosus*, comúnmente *Lactobacillus GG*), se observó la liberación de péptidos después de que la leche fermentada se sometió a una digestión con pepsina y tripsina; las fracciones se separaron con cromatografía líquida de alta resolución para proteínas (FPLC) y se analizaron con espectrofotometría de masas. Se hizo una comparación de los pesos moleculares con los reportados en la literatura. El análisis reveló ocho péptidos liberados y se identificaron como: dos inmunoestimulantes, cuatro opioides y dos inhibidores de enzima convertidora de angiotensina ACE (Rokka y col., 1997).

Otros ejemplos son: la producción de leches fermentadas con *L. helveticus* que genera péptidos antihipertensivos y una leche fermentada japonesa inoculada con esta cepa y además con *S. cereviceae*, generan un inhibidor de ACE (Smacchi y Gobbetti, 2000, Meisel, 2004).

Durante la fermentación de leche se obtienen diferentes productos de hidrólisis de acuerdo a las características particulares de la bacteria láctica utilizada para la fermentación. Estos productos de hidrólisis pueden ser péptidos biológicamente activos. Las proteínas de leche, principalmente las caseínas, son generadoras de gran cantidad de péptidos bioactivos durante la fermentación láctica. Estos péptidos generados se encuentran en gran medida encriptados en la cadena polipeptídica de las proteínas. Durante el proceso de hidrólisis estos péptidos se hacen disponibles. Algunos de estos péptidos cumplen con el rol de moduladores metabólicos, “para contribuir a la buena salud”. Por ello es interesante producirlos comercialmente y usarlos como parte de alimentos que provean beneficios a la salud (Smacchi y Gobbetti, 2000, Murray y Fitzgerald, 2007).

2.3. Péptidos bioactivos.

Además del valor nutricional, determinado por la composición y adecuada digestibilidad de sus aminoácidos (Schlimme y Meisel, 1995; Meisel, 2004), las proteínas lácteas poseen distintas propiedades biológicas. Se ha descrito el papel fisiológico de las proteínas lácteas como fuente de “péptidos bioactivos o funcionales”. Estos péptidos se definen como secuencias de aminoácidos inactivas en el interior de la proteína precursora, pero capaces de ejercer determinada actividad biológica tras su liberación mediante hidrólisis química o enzimática. Generalmente, son péptidos de pequeño tamaño, de 3 a 20 aminoácidos, liberados durante el procesado industrial de los alimentos o bien, durante la digestión gastrointestinal (Meisel, 2005).

Las diferentes actividades biológicas para estos péptidos, son diversas e incluyen la actividad opiácea, la inmunomoduladora, la antimicrobiana, la antitrombótica, la acarreadora de minerales, la antihipertensiva, entre otras.

2.3.1. Actividad opiácea.

El estudio de la actividad opiácea en un hidrolizado de proteínas lácteas dio lugar al nacimiento del concepto de exorfina, o péptido opiáceo de origen dietético, en contraposición al de endorfina o péptido endógeno (Fazel, 1998)

Como agonistas opiáceos se incluyen los derivados de las caseínas, como las β -casamorfina, fragmentos incluidos en la zona f(60-70) de la BCN y ligandos de los receptores μ (Trompette y col., 2003) y las exorfinas, fragmentos procedentes de la AS1CN (Loukas y col., 1983) y ligandos de los receptores δ . La α -lactorfina, que corresponde al fragmento f(50-53), la β -lactorfina, fragmento f(102-105) y la serorfina fragmento f(399-404) son agonistas de los receptores opiáceos μ , derivados de la ALA, la BLG y la BSA, respectivamente (Pihlanto-Leppälä, 2000; Shah, 2000).

La característica estructural común entre los agonistas opiáceos endógenos y exógenos es la presencia de tirosina en el extremo amino terminal (excepto los derivados de la ACN). La carga negativa localizada en el grupo fenólico de la tirosina se ha descrito como esencial para la actividad opiácea, ya que la eliminación de este aminoácido provoca la pérdida de actividad del péptido (Chang y col., 1981, Philanto-Leppälä, 2000). La presencia de otro aminoácido aromático, fenilalanina o tirosina en la tercera o cuarta posición favorece la fijación del péptido al receptor opiáceo (Meisel, 1998; Clare y Swaisgood, 2000). Además la prolina en segunda posición es crucial para la actividad biológica, ya que mantiene la orientación de las cadenas de los aminoácidos tirosina y fenilalanina (Paterlini y col, 2000; Leitgeb y Tóth, 2005).

Tras ser ingeridos en el alimento o tras liberarse durante la digestión gastrointestinal, las β -casamorfina pueden ejercer los efectos a nivel local, que solo se han descrito en animales adultos. Así se ha estudiado la reducción del grado de vaciamiento gástrico y de la motilidad intestinal en ratas (Mihatsch y col., 2005) y el efecto antisecretorio en el íleon de conejo (Tomé y col., 1987). En humanos se han detectado fragmentos opiáceos en el contenido intestinal tras la ingestión de leche de vaca (Sienkiewicz-Szlapka y col., 2009), no detectándose en el suero sanguíneo, aunado a estos estudios, se han realizado otros donde se ha reportado la presencia de péptidos opioides en el intestino de infantes, después de la ingesta de leche (Kost y col., 2009) y estudios encaminados a la simulación del proceso de digestión de fórmulas lácteas infantiles (De-Noni, 2008). La confirmación en el hombre de los efectos encontrados en los animales de experimentación abriría un nuevo campo de aplicación de estos péptidos opiáceos en la prevención y el tratamiento de desórdenes intestinales.

Los péptidos antagonistas opiáceos suprimen la actividad agonista de las encefalinas, produciendo el mismo efecto que la naloxona (Hartmann y Meisel, 2007). Este grupo de péptidos incluye las casoxinas, procedentes de la KCN y de la AS1CN (Fosset y Tomé, 2001), ligandos de los receptores μ con baja actividad

comparada con la de la naloxona y las lactoferroxinas, derivados de la lactoferrina, que actúan como ligandos de los receptores μ con moderada actividad (Yoshikawa y col., 1988).

2.3.2. Actividad antitrombótica.

Secuencias peptídicas de la KCN, denominadas casoplatelinas son similares a la cadena γ del fibrinógeno humano (Clare y Swaisgood, 2000). Se han comprobado *in vitro* que los péptidos derivados del extremo carboxilo terminal de la KCN bovina y fundamentalmente el fragmento f (106-116) son inhibidores de la agregación plaquetaria y de la unión de la cadena γ del fibrinógeno humano al receptor específico de la membrana de las plaquetas (Jollès y col., 1986; Hartmann y Meisel, 2007). La característica estructural similar entre la cadena γ del fibrinógeno y las casoplatelinas, responsable de la competencia en el proceso de agregación de las plaquetas, es la homología en la secuencia de los aminoácidos isoleucina, lisina y asparagina en las posiciones 108, 112 y 115, respectivamente (Shah, 2000).

La actividad antitrombótica ejercida por el fragmento Lys-Arg-Asp-Ser, derivado de la lactoferrina, se debe a otro mecanismo de acción, ya que inhibe de manera dosis-dependiente, la agregación plaquetaria inducida por el difosfato de adenosina (ADP), debido a la homología con el fragmento f(572-575) de la cadena α del fibrinógeno (Mazoyer y col., 1990). Se ha comprobado *in vivo* que este fragmento inhibe la formación de trombos en la arteria coronaria de perros (Shebuski y col., 1989) y prolonga el tiempo de sangrado en la arteria mesentérica del hámster (Cook y col., 1988). Además se ha descrito el efecto antitrombótico de este péptido sobre la trombosis inducida por láser en rata y cerdo (Drouet y col., 1990). Actualmente, se han realizado estudios de aislamiento de este fragmento, en leches fermentadas y se ha discutido ampliamente sus funciones y usos (Phelan y Kenns, 2011)

Se han encontrado secuencias peptídicas en el plasma de recién nacidos alimentados con leche materna o con fórmulas maternizadas elaboradas con leche de vaca, en concentración suficiente para ejercer el efecto antitrombótico *in vivo*, lo que demuestra su liberación a partir de las proteínas lácteas durante el proceso de digestión gastrointestinal (Chabance y col., 1995; Severin y Wenshui, 2005). Por otra parte se ha demostrado la presencia de péptidos antitrombóticos en el estómago, duodeno y posteriormente en la sangre de adultos que habían ingerido leche o yogurt (Chabance y col., 1998; Silva y Malcata, 2005), lo que demuestra la capacidad de las bacterias lácticas de hidrolizar las proteínas lácteas y formar péptidos bioactivos durante el proceso de fermentación, así como la capacidad del tracto gastrointestinal de absorber cadenas peptídicas.

2.3.3. Actividad inmunomoduladora.

Los péptidos responsables de esta actividad son fragmentos derivados de la AS1CN de la BCN, de la KCN (Silva y Malcata, 2005) y de la ALA (Kayser y Meisel, 1996, Korhonen y Philanto-Lepälä, 2006).

El mecanismo de acción de estos péptidos no es conocido, aunque la hipótesis más aceptada describe la unión de receptores opiáceos situados en la membrana de los linfocitos, lo que influye en su actividad inmunoreactiva. Se ha identificado el aminoácido arginina de los extremos amino o carboxilo terminal como la zona reconocida por los receptores específicos de la membrana de los linfocitos y los macrófagos (Kayser y Meisel, 1996; Chan y col., 2006).

Se ha visto que el péptido tirosina-glicina (Tyr-Gly), que corresponde a los fragmentos f(18-19) y f(50-51) de la ALA y el fragmento f(38-39) de la KCN y el péptido Tyr-Gly-Gly que corresponde al fragmento f(18-20) de la ALA, modulan la producción de linfoquinas *in vitro* (Kayser y Meisel, 1996), por lo que se han empleado en la inmunoterapia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (SIDA), ya que reducen notablemente el progreso hacia la fase

clínicamente relevante de la enfermedad (Rutherford-Markwick y Moughan, 2005). La isracidina, fragmento f(1-23) de la AS1CN, permite el desarrollo de inmunidad a largo plazo frente a la reinfección por *Staphylococcus aureus* (Fazel, 1998; Meisel, 2004).

Los efectos de estos péptidos se han comprobado tras la administración intravenosa de los mismos, pero no existen en la actualidad estudios concluyentes sobre los efectos inmunomodulatorios ejercidos tras su ingestión.

2.3.4. Actividad antimicrobiana.

La inhibición *in vitro* del crecimiento de cepas patógenas tiene lugar por la acción de fragmentos de las caseínas y de la lactoferrina. El efecto antimicrobiano de los péptidos derivados de las proteínas lácteas parece estar relacionado con la carga neta positiva de estos péptidos. Un gran porcentaje de los aminoácidos constituyentes son básicos y entre ellos forman un bucle en forma de α -hélice en el extremo carboxilo terminal (Kang y col., 1996; Sato y Feix, 2006), que provoca la formación de canales iónicos en la membrana de los microorganismos, alternando su permeabilidad y provocando la muerte celular (Clare y col., 2003).

El fragmento f(1-23) de la AS1CN o isracidina, obtenido tras la hidrólisis por la quimosina, ejerce *in vivo* actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, a concentraciones comparable con la de antibióticos conocidos (Lahov y Regelson, 1996; Haque y Chand, 2008). Además se han descrito con actividad antimicrobiana distintos fragmentos derivados de la AS2CN, como la casocidina-I o fragmento f(165-203), que inhibe el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus carnosus* (Zucht y col., 1995, Gobbetti y col., 2004). Las secuencias peptídicas f(164-179) y f(183-207), aisladas a partir de un hidrolizado de la AS2CN con pepsina, inhiben el crecimiento de *Bacillus cereus* y *Escherichia coli* (Zucht y col., 2001; McCann y col., 2005). La lactoferrina, fragmento f(17-41), aislada de un hidrolizado con pepsina, presenta propiedades

antibacterianas *in vitro* frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos, de los géneros *Bacillus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Proteus*, *Pseudomonas*; *Salmonella*, *Streptococcus* y levaduras como *Candida* (Steijns y Hooijdonk, 2000). El tamaño reducido de este péptido respecto al de la lactoferrina, favorece su acceso a las zonas de acción en la superficie microbiana.

Los efectos *in vivo* de estos péptidos se han demostrado tras su administración por vía intravenosa. Sin embargo, no existen estudios de la influencia del proceso de digestión gastrointestinal sobre la actividad antimicrobiana de estos péptidos, ni de estudios de adición a alimentos para evitar la contaminación por patógenos.

2.3.5. Péptidos acarreadores de metales.

Los caseinofosfopéptidos son fragmentos derivados de la AS1CN, AS2CN y BCN. La mayoría de estos péptidos posee una secuencia con tres grupos fosforina seguida de dos glutámicos. Las cadenas laterales negativas, en particular la de los grupos fosfato, son las responsables de la unión de los minerales, especialmente del calcio (Meisel y Fitzgerald, 2003). Además, las secuencias próximas a los grupos fosforilados determinan las diferencias en la actividad quelante del calcio de los distintos caseinofosfopéptidos (Schlimme y Meisel, 1995).

Estos péptidos ejercen efectos en la absorción del calcio y de otros elementos traza en el intestino, además de inhibir la formación de caries mediante la recalificación dental (Clare y Swaisgood, 2000).

2.3.6. Actividad antihipertensiva.

La hipertensión arterial es un proceso multifactorial. La inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) es el mecanismo de acción más estudiado. En proteínas de origen animal, la actividad inhibitoria de la ACE se ha

determinado en hidrolizados de gelatina bovina (Kim y col., 2001), de músculo de sardina (Matsufuji y col., 1994; Osajima y col., 1994), de bonito (Matsumura y col., 1993) o de atún (Kohama y col., 1988 y 1991) y en hidrolizados de músculo de gallina (Fujita y col., 2000). También se han obtenido a partir de proteínas vegetales aisladas y purificadas, como la α - y γ -zeína. La actividad inhibitoria de la ACE se ha determinado mediante procesos de síntesis (Maruyama y col., 1989) y procesos hidrolíticos (Miyoshi y col., 1991; Yano y col., 1996) y en otros estudios a partir de hidrolizados de albumina y globulina de amaranto (Tovar-Pérez y col., 2009). Entre las proteínas de origen animal más estudiadas como fuente de péptidos inhibidores de la ACE son las proteínas lácteas, principalmente caseínas (Silva y Malcata 2005). También, se ha reportado estudios sobre proteínas de suero como fuente de péptidos con actividad inhibitoria de la ACE (Mullally y col., 1997a y b; Pihlanto-Leppälä y col., 2000; Yalcin, 2006).

Otra de las enzimas involucradas en la regulación de la presión arterial es la enzima convertidora de endotelina (ECE). Cataliza la formación de endotelina-I a partir de su precursor (Yanagisawa y col., 2000). La endotelina-I es un potente vasoconstrictor, lo que favorece el incremento de la presión arterial. Por lo tanto la inhibición de la ECE produce un efecto antihipertensivo. Solo se han descrito péptidos inhibidores de esta enzima a partir de un hidrolizado digestivo del bonito (Okitsu y col., 1995), pero el alto contenido y variedad de proteínas presentes en la leche podrían abrir un nuevo campo de estudio encaminado a la identificación de péptidos lácteos con esta actividad.

Por otra parte, la acción de péptidos, como la α -lactorfina, fragmento f(50-53) de la ALA, sobre los receptores opiáceos, provocan el descenso de la presión arterial tras la administración por vía subcutánea (Nurminen y col., 2000, Gobbetti y col., 2006).

2.3.7. Mecanismo de acción de la enzima convertidora de angiotensina.

La ACE (EC 3.4.15.1) actúa en el sistema renina-angiotensina, hidrolizando la angiotensina-I, deca péptido inactivo, de secuencia DNVYIHPFHL, producido por la acción de la renina. La hidrólisis conduce a la liberación de la angiotensina-II y el dipéptido C-terminal Hys-Leu (Fitzgerald y Meisel, 2000). La angiotensina-II es un compuesto de elevada potencia vasoconstrictora. Su acción provoca la contracción rápida de las arteriolas, y por tanto, el incremento de la presión arterial. Además, estimula la secreción de aldosterona por las glándulas suprarrenales, hormona que induce la retención de sodio y agua y la excreción de potasio. La acumulación de agua provoca el incremento del volumen extracelular (Tirelli y col., 1997), el consecuente aumento de la presión arterial y la neutralización de la producción de renina. La ACE actúa de manera simultáneamente en el sistema quinina-caliceína, catalizando la degradación de las bradiquininas (Schmieder y col., 2007), compuestos de potente acción vasodilatadora. Esta acción favorece el incremento de la presión arterial (Fig. 1).

Se ha demostrado que la inhibición de la ACE provoca el descenso de la presión arterial en el hombre y en animales (Ferrairo y col, 2005). Se han identificado varios péptidos endógenos que actúan como inhibidores y sustratos competitivos de la ACE, como las encefalinas, las bradiquininas y la sustancia P. como primeros inhibidores exógenos se estudiaron los extractos de veneno de serpiente *Bothrops jararaca*. Estos extractos presentan un doble efecto. Potencian la actividad de la bradiquinina (Lanzer y col., 2004) e inhiben la ACE, tanto *in vitro* como *in vivo* (Hayashi y Camargo, 2005). Actualmente un derivado sintético, el captopril (D-3-mercapto-2-metilpropanoil-1-prolina; $IC_{50} = 0,006 \mu M$), obtenido tras el estudio del modelo hipotético del sitio activo de la enzima, es el fármaco más usado en el control de la hipertensión (Holman y col., 2008).

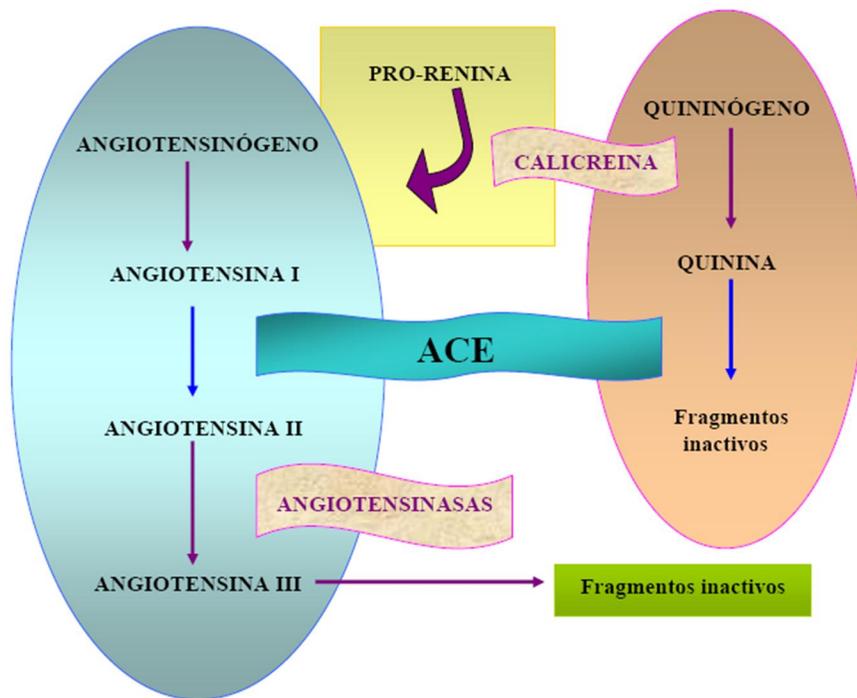


Figura 1. Sistema renina-angiotensina y quinina-caliceína. Acción de la enzima convertidora de angiotensina (ACE).

La unión de los péptidos de la ACE está influida por la secuencia tripeptídica C-terminal de los mismos, que puede interactuar con tres regiones del centro activo de la ACE (Araujo y col., 2000) Así, los aminoácidos de carácter hidrofóbico, como triptófano, tirosina, fenil-alanina o prolina, favorecen la unión a estas zonas. El péptido con secuencia C-terminal Phe-Ala-Pro, análogo al encontrado en el inhibidor presente en el extracto de veneno de serpiente es uno de los más favorables para unirse al centro catalítico. La carga positiva del grupo guanidino o del grupo ϵ -amino de la arginina o lisina, respectivamente, contribuyen a la potencia inhibitoria (Cheung y col., 1980; Binevski y col., 2003). La presencia de aminoácidos dicarboxílicos en la secuencia peptídica o de prolina como penúltimo aminoácido disminuye o anula la actividad inhibitoria de la ACE (Baudin, 2002). El extremo N-terminal también influye en la actividad, y así, la presencia de valina o de isoleucina en esta posición incrementa la actividad inhibitoria de la ACE en el péptido (Binevski y col., 2003).

2.3.8. Péptidos derivados de las proteínas de leche inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) obtenidos por hidrólisis enzimática.

La liberación de péptidos bioactivos a partir de proteínas de la leche, se ha llevado a cabo por su hidrólisis empleando un gran número de enzimas, de origen animal, vegetal y microbiano. Se han optimizado las condiciones de temperatura, concentración, pH, etc., con el objetivo de modificar la resistencia de las proteínas al ataque de la enzima, de inducir nuevos sitios de ruptura y obtener nuevas fracciones bioactivas (Briand y col., 1994). Los procesos enzimáticos tienen preferencia sobre los químicos debido al menor riesgo de reacciones colaterales y a su capacidad para tener lugar en condiciones fisiológicas, no desnaturizantes (Otte y col., 1997). Además, las enzimas proteolíticas son el mejor instrumento para analizar la secuencia de la proteína, para aislar y caracterizar los diferentes péptidos derivados de la misma.

El aislamiento y caracterización de péptidos bioactivos se ha realizado fundamentalmente a partir de digeridos *in vitro* de proteínas lácteas (Pihlanto-Lepälä y col., 2000; Wu y Ding, 2001; Vermeirssen y col., 2004; Saito, 2008). Para ello se han empleado las enzimas responsables de la digestión gastrointestinal como pepsina y tripsina y la quimotripsina pancreática. Se han reportado estudios más efectivos con el aislamiento *in vivo* y la caracterización de péptidos inhibidores de la ACE a partir del quimo gastrointestinal (Fitzgerald y Meisel, 2000; Vermeirssen y col., 2004). La estructura abierta y flexible de las caseínas les hace muy susceptibles a la hidrólisis, lo que permite la liberación de un gran número y variedad de péptidos (Yamamoto y Takano, 1999).

Las enzimas microbianas han sido incorporadas de manera satisfactoria en la obtención de péptidos bioactivos. Así, el empleo de las enzimas procedentes de bacterias lácticas, como *Lactobacillus helveticus*, han permitido la obtención de péptidos inhibidores de la ACE derivados de las caseínas. Yamamoto y col., (1994) han empleado para la hidrólisis de las caseínas, una proteinasa asociada a

la pared celular de *Lactobacillus helveticus* CP790. Esta enzima es capaz de hidrolizar la AS1CN, AS2CN y BCN. Hidroliza inicialmente los enlaces localizados en la región hidrofóbica C-terminal de la BCN, aunque se ha visto también que es capaz de hidrolizar los enlaces situados en la zona N-terminal hidrofílica de la AS1CN y de la BCN (Maeno y col., 1996). Sin embargo, la KCN no es susceptible a la acción de dicha enzima. Los péptidos liberados, generalmente, son de gran tamaño y baja actividad inhibitoria de la ACE. Solo el fragmento f(43-69) de la BCN es muy activo, con un valor de IC₅₀ de 4 μM (Yamamoto y col., 1994).

La hidrólisis de las proteínas de suero de leche se ha llevado a cabo con enzimas microbianas de distinto origen, fundamentalmente la proteinasa K y la termolisina. Los hidrolizados obtenidos tras la acción de estas enzimas sobre concentrados de proteínas de suero presentan porcentajes de inhibición de la ACE superiores al 95% (Saito y col., 1997). La proteinasa K (EC 3.4.21.14) procedente de *Tritirachium album*, rompe los enlaces X-Y, en los que Y es un aminoácido aromático o hidrofóbico. Hidroliza rápidamente la ALA y la BLG (Schmidt y Poll, 1991; Guo y col., 2008). Abubakar y col., (1998) han aislado el péptido IPA, a partir de un hidrolizado de un suero de quesería con proteinasa K, correspondiente al fragmento f(78-80) de la BLG, con un valor de IC₅₀ de 141 μM.

La termolisina (EC 3.4.24.2) que procede de la bacteria *Bacillus thermoproteolyticus*, rompe los enlaces X-Y, en los que X es leucina, fenil-alanina, isoleucina, valina, metionina o alanina e Y no debe de ser prolina. Hidroliza lentamente las dos proteínas de suero de leche mayoritarias, con la liberación de péptidos de menor tamaño durante los primeros veinte minutos de incubación (Schmidt y Poll., 1991; Hernández-Ledezma, 2006).

2.3.9. Péptidos derivados de proteínas de leche inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) obtenidos por fermentación.

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 lactobacilos y las bifidobacterias se han convertido en los probióticos más empleados en la elaboración de diferentes productos lácteos fermentados como el yogurt y el queso. Estas bacterias poseen enzimas proteolíticas capaces de hidrolizar las proteínas lácteas liberando péptidos y aminoácidos, que utilizan como fuente de nitrógeno, esencial para su crecimiento. Además estos péptidos liberados, durante el proceso de fermentación pueden ejercer distintas actividades biológicas que podrían contribuir a las propiedades beneficiosas atribuidas a los productos lácteos fermentados y a las propias bacterias lácticas (Korhonen y Pihlanto-Lepälä, 2006).

Algunos de los péptidos liberados tras la acción de los microorganismos durante la fermentación de la leche, pueden ejercer la actividad inhibitoria de la ACE, por lo que se ha sugerido que los productos fermentados podrían ser empleados en la prevención y el tratamiento de la hipertensión. Sin embargo los resultados de los estudios difieren de unos autores a otros. Se ha observado que la acción de los fermentos es decisiva, por lo que las características del producto final dependerán del cultivo iniciador empleado en el proceso de fermentación (Matar y col., 1997; Clare y Swaisgood, 2000; Korhonen y Pihlanto-Lepälä, 2003).

Tanto las bacterias ácido-lácticas empleadas como cultivo iniciador, como la microflora endógena de la leche poseen un sistema proteolítico constituido por proteinasas unidas a la pared celular y peptidasas intracelulares (Kunji y col., 1996; Savijoki y col., 2006). Durante el procesado y almacenamiento de los productos fermentados, las proteinasas son capaces de hidrolizar las proteínas del alimento para generar oligopéptidos (Poolman y col., 1995; Juille y col., 2005). Los di- tri- y oligopéptidos de pequeño tamaño pueden ser transportados, mediante sistemas específicos de transporte de la bacteria, hasta el interior de la célula, donde las peptidasas de la membrana plasmática los hidrolizan formándose péptidos de menor tamaño y aminoácidos libres. Además los péptidos de mayor tamaño que no pueden ser transportados al interior de la célula también pueden ser fuente de péptidos bioactivos tras su degradación por las peptidasas

intracelulares liberadas durante la lisis celular (Poolman y col., 1995; Law y Haandrikman, 1997). Los péptidos originados contribuyen, por tanto, al cambio en las propiedades reológicas, sensoriales y biológicas del producto fermentado (Korhonen y col., 1998).

Sin embargo Meisel y Bockelmann, (1999) han reportado que, durante la elaboración de las leches fermentadas y debido a la breve duración del proceso y a la especificidad de las enzimas peptidásicas, es poco probable la liberación de péptidos bioactivos. La actividad proteolítica de las bacterias lácticas es baja y solo provoca la hidrólisis del 1-2% de las proteínas de la leche durante el proceso de elaboración del yogur (Perdigon y col., 1991). Sin embargo otros autores han descrito la capacidad de las proteinasas de las bacterias lácticas para hidrolizar más del 40% de los enlaces peptídicos de las caseínas (Juillard y col., 1995; Kunji y col., 1996; Mierau y col., 1997, Juille y col, 2005), generando un gran número de péptidos, que podrían ser degradados por el sistema peptidásico para la liberación de péptidos bioactivos. La discrepancia entre estos se debe a la dependencia del grado de proteólisis en función del microorganismo empleado en cada estudio (Marshall y Tamime, 1997), así como de las condiciones del proceso de fermentación.

2.3.10. Péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) en leches fermentadas.

Lactobacillus helveticus posee mayor actividad proteolítica sobre las proteínas lácteas que otras bacterias lácticas, en consecuencia el contenido peptídico de la leche fermentada por esa bacteria es mayor (Leclerc y col., 2002). A partir de esta leche fermentada con *L. helveticus*, Yamamoto y col., (1999) han aislado el péptido de secuencia YP, que puede originarse de la AS1CN, la BCN y/o la KCN. Su actividad inhibitoria de la ACE es baja ($IC_{50} = 720 \mu M$). También se han aislado otros péptidos inhibidores de la ACE formados a partir de BCN y KCN durante la fermentación de la leche con otras bacterias lácticas, *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* (*Lactobacillus* GG) (Rokka y col., 1997), *Lactobacillus*

delbrueckii subsp. *bulgaricus* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Gobbetti y col., 2000), *Enterococcus faecalis* (Quirós y col., 2006).

Actualmente, en el aislamiento y la caracterización de péptidos inhibidores de la ACE se están empleando algunas cepas de levaduras, capaces de hidrolizar las proteínas lácteas. Así la combinación de *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae* ha permitido la obtención de una bebida fermentada, con capacidad para prolongar la vida en animales de experimentación e inhibir tumores inducidos en ratas (Fitzgerald y Meisel, 2000), además, de presentar su actividad inhibitoria de la ACE. A partir de esta leche fermentada se han aislado dos tri-péptidos, de secuencia VPP, fragmento f(84-86) de la BCN e IPP, fragmentos f(74-76) y f(108-110) de la BCN y la KCN, respectivamente (Nakamura y col., 1995). Los valores de IC₅₀ son de 9 µM para el péptido VPP y de 5 µM para el péptido IPP. Estos dos fragmentos no se obtienen por la hidrólisis de las caseínas con la proteinasa aislada de *Lactobacillus helveticus*, lo que demuestra la acción de las peptidasas intracelulares durante la fermentación (Yamamoto y Takano, 1999).

En algunos casos y debido al corto tiempo del proceso de fermentación, ha sido necesario llevar a cabo la hidrólisis de la leche o del suero con enzimas digestivas o microbianas previa a la fermentación. Así, Saito y col., (1997) no observó cambios en la actividad inhibitoria de la ACE tras el proceso de fermentación de un suero de quesería hidrolizado con proteinasa K y fermentado posteriormente con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Sin embargo el suero hidrolizado con pepsina, tripsina y termolisina, fermentado con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, presentó una disminución de la actividad de la ACE. Este descenso puede ser debido al consumo parcial de los péptidos, por los microorganismos; como fuente de nitrógeno, tras la hidrólisis por las enzimas bacterianas.

Por el contrario, el proceso de fermentación previo a la hidrólisis supone un incremento de la actividad. Así, Rokka y col., (1997) han descrito altos valores de actividad inhibitoria de la ACE en una leche fermentada con *Lactobacillus* GG y posteriormente hidrolizada con tripsina y pepsina. Incluso, se han aislado péptidos con actividad inhibitoria de la ACE procedentes de la ALA y de la BLG a partir de un suero fermentado e hidrolizado con una combinación de pepsina y tripsina (Pihlanto-Leppälä y col., 1998). Estudios más recientes han demostrado este aumento en la actividad de la enzima en una leche fermentada con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en combinación con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, después de realizar la digestión con tripsina y quimotripsina (Gobbetti y col., 2000). Inclusive el uso de extracto pancreático, tiene efecto sobre este incremento (Hernández-Ledezma y col., 2004).

2.3.11. Efectos *in vivo* de los péptidos derivados de proteínas de leche inhibidores de la ACE.

La capacidad de un péptido para desarrollar la actividad antihipertensiva *in vivo* depende de distintos factores, como el procesado al que ha sido sometido el alimento, la estabilidad del péptido, su biodisponibilidad y el mecanismo de inhibición de la ACE (Yamamoto y Takano, 1999). Los péptidos bioactivos pueden originarse durante el procesado de los alimentos, como en el caso de las fórmulas infantiles hipoalergénicas y las fórmulas enterales, que se elaboran a partir de proteínas parcialmente hidrolizadas (Meisel, 1998).

Los péptidos bioactivos también pueden formarse durante el proceso de digestión en el tracto gastrointestinal. La digestibilidad esta influida por las condiciones del procesado y por las interacciones antagónicas y sinérgicas con otros componentes de la dieta (Meisel y col., 1989). Los péptidos de bajo peso molecular son muy reactivos, pudiendo interaccionar con carbohidratos y lípidos. Una vez hidrolizados los fragmentos por las enzimas digestivas, pepsina, tripsina y quimotripsina, fundamentalmente, los péptidos liberados pueden ejercer el efecto a nivel del tracto digestivo, actuando sobre los receptores de la mucosa intestinal.

Aquellos péptidos resistentes a la hidrólisis pueden ser absorbidos a través de la barrera intestinal y alcanzar la circulación sistémica, como lo han demostrado los estudios realizados por Gobbetti y col., 2000, donde se utilizó una leche fermentada por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en combinación con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, realizando estudios *in vivo* e *in vitro*. De igual manera se comprobó un mecanismo de transporte de di- y tri-péptidos independientes de la secuencia aminoacídica (Döring y col., 1998). Por lo tanto, las diferencias entre los resultados obtenidos *in vivo* y la actividad inhibitoria de la ACE *in vitro* se debe a la afinidad de los péptidos al mecanismo de transporte a través de la barrera intestinal y a la resistencia a las peptidasas, tanto intestinales como sanguíneas (Saito y col., 1994). Además una elevada actividad antihipertensiva en fragmentos con baja actividad inhibitoria de la ACE puede ser debida a la acción de dichos fragmentos mediante otro mecanismo de acción. Esto se ha observado en fragmentos de las caseínas, como el fragmento f(169-175) de la BCN (Maeno y col., 1996).

Se han llevado a cabo distintos estudios con animales de experimentación y ensayos clínicos encaminados a determinar la actividad antihipertensiva de hidrolizados de caseínas y de proteínas de suero con enzimas digestivas y microbianas. Así se ha comprobado el descenso de la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas tras la administración intraperitoneal y oral de un hidrolizado de caseína y de los fragmentos f(23-34) y f(194-199) de la AS1CN y f(177-183) de la BCN (Karakı y col., 1990); otro estudio realizado por Fuglsang y col (2002), demostró este mismo efecto, administrando una fracción peptídica aislada de una leche fermentada con *Lactobacillus helveticus*, dicha fracción un IC₅₀ de 0.16 mg/mL. La hidrólisis de suero de quesería con la proteinasa K conduce a la obtención de un hidrolizado con efecto depresor de la presión sistólica en ratas espontáneamente hipertensas, siendo el máximo responsable de esta actividad el péptido IPA, fragmento f(78-80) derivado de la BLG (Abubakar y col., 1998).

Los estudios *in vivo* también se han llevado a cabo en productos lácteos fermentados con distintas bacterias lácticas. La actividad antihipertensiva puede ser debida a la inhibición de la ACE o bien a otros mecanismos de acción. La leche fermentada Calpis® produce la disminución de la presión sistólica en ratas espontáneamente hipertensas (Nakamura y col., 1995; Takano, 1998; Fitzgerald y col., 2004) y en humanos hipertensos (Hata y col., 1996). A partir de esta leche se han aislado los fragmentos VPP e IPP, de alta actividad inhibitoria de la ACE. Debido a la resistencia conferida por la prolina estos péptidos no se degradan a nivel digestivo, por lo que se absorben intactos (Fitzgerald y col., 2004) y alcanzan la aorta abdominal, produciendo el efecto antihipertensivo. Además el tratamiento de humanos hipertensos con esta leche no altera el metabolismo lipídico ni produce los efectos colaterales característicos de los fármacos antihipertensivos, como los diuréticos y los β -bloqueantes (Hata y col., 1996).

Sin embargo, otros péptidos como el fragmento YP, presente en la secuencia de la AS1CN, BCN y KCN y aislado de una leche fermentada con *Lactobacillus helveticus* presentan baja actividad inhibitoria de la ACE y alta actividad antihipertensiva (Yamamoto y col., 1994; Fitzgerald y Meisel, 2000). Este efecto antihipertensivo puede deberse a la inhibición de la quimasa, enzima responsable de la formación de la angiotensina-II en el corazón y en los vasos coronarios (Urata y col., 1993). Otro mecanismo de acción antihipertensiva en humanos hipertensos ha sido descrito por Kuwabara y col., (1995) en una leche fermentada con una combinación de bacterias lácticas y *Lactobacillus casei*. Este mecanismo involucra la acción de unos compuestos polisacáridos glicopeptídicos que mejoran la síntesis de las prostaglandinas I_2 y reducen la resistencia vascular periférica.

2.3.12. Otras actividades biológicas.

Se ha descrito la actividad antioxidante ejercida por la leche humana (VanderJagt y col., 2001; Hanna y col., 2004). Además, mediante ensayos *in vitro*

se ha comprobado esta actividad tanto en las caseínas, capaces de quelar el hierro e inhibir la peroxidación lipídica (Cervato y col., 1999; Kitts, 2005) como en las proteínas del suero (Tong y col., 2000; Pihlanto-Lepälä, 2006). Sin embargo, son necesarios nuevos estudios que confirmen la acción antioxidante de las proteínas lácteas en animales de experimentación y en humanos (Gill y col., 1996).

Otras actividades biológicas de interés en la aplicación dietética y farmacéutica incluyen la inhibición de la secreción ácida de gastrina y de la motilidad gastrointestinal (Fiat y col., 1993), así como la inducción de la producción de colicistoquinina, hormona relacionada con la saciedad, ejercida por el CMP (Corring y col., 1997).

La antriopeptina es un péptido presente en forma natural en la leche que actúa como un fuerte diurético, natriurético y vasorelajante, además de jugar un papel importante en la adaptación del neonato a la vida extrauterina (Jezova y col., 1996).

Se han reportado estudios basados en la búsqueda de péptidos con actividad antitumoral, anticancerígena y antiviral, particularmente frente al virus del SIDA (Smacchi y Gobbetti 2000; Berkhout y col., 2004).

2.4. Sistema proteolítico de bacterias lácticas y de *Streptococcus thermophilus*.

El sistema proteolítico de bacterias lácticas se ha estudiado con gran detalle por métodos, genéticos, bioquímicos y ultraestructurales. Algunas investigaciones se han centrado en la producción de péptidos bioactivos por acción específica del sistema proteolítico, durante la fermentación de leche (Savijoki y col., 2005). Adicional a ello se ha podido comprobar que los sistemas de lactococos y lactobacilos guardan una estrecha relación (Kunji y col., 1996). Sin embargo, el sistema proteolítico de *Streptococcus thermophilus* tiene diferencias

específicas, que lo han hecho un sistema de bacterias lácticas, de estudios particulares. La cascada de reacciones proteolíticas que se dan durante el crecimiento de lactococos y lactobacilos en leche, se inicia por la acción de endopeptidasas extracelulares bien estudiadas. Estas proteinasas liberan péptidos derivados de caseína de tamaño variable. Estos péptidos son sustratos naturales de peptidasas que después los convierten a péptidos más pequeños y aminoácidos. Al parecer muchas de estas peptidasas están localizadas en el interior de las células y como consecuencia, el rompimiento proteolítico final se lleva a cabo después del transporte de los péptidos al interior. Pero en general, el sistema consiste de una serie de reacciones en cascada que inician por una serino-proteinasa prolino-específica localizada extracelularmente, transporte específico de di-, tri- y oligopéptidos y reacción de un sinnúmero de peptidasas y aminopeptidasas intracelulares (Gasson y de Vos, 1994; Savijoki y col., 2005).

Se ha establecido perfectamente, que muchas bacterias ácido lácticas, aisladas de productos lácteos, son multi-auxótrofas de aminoácidos (Chopin, 1993, Leroy y De Vuyst, 2004). Estos requerimientos son dependientes de cada cepa, así pueden ir desde los 4 (algunas cepas de *Lactobacillus* GG) hasta los 14-20 aminoácidos (algunas cepas de *Streptococcus thermophilus*). Como en la leche la concentración de aminoácidos libre y péptidos es muy baja, todas ellas dependen de su sistema proteolítico para sobrevivir (Kunji y col., 1996; Letrot y col., 2002)

2.4.1. Las proteinasas de las bacterias lácticas.

Muchos estudios han establecido que la degradación de las caseínas se inicia por una proteinasa extracelular, ligada a la pared celular (PrpP) (Pritchard y Coolbear, 1993; Poolman, y col., 1995; Savijoki y col., 2005), se ha dividido en dos grupos tipo PI y tipo PIII, debido a su especificidad. Esta proteinasa, es una serino proteinasa monomérica con peso de 180-190 kDa aunque Laan y Konings (1989) encontraron algunas fracciones asociadas a esta durante el aislamiento. Se ha

clonado y secuenciado, de muchas bacterias lácticas, el gen que codifica para PrtP, con lo cual se ha podido determinar que la estructura primara consta de alrededor de 1902 aminoácidos para lactococos a 1946-1962 aminoácidos en especies de lactobacilos (Kunji y col., 1996). Al hacer las comparaciones se ha comprobado una similitud del 98% en los primeros y 95% en los segundos. Aunque para *Lactobacillus delbrückii* hay una similitud del 40% con la de otras especies de lactobacilus, el número de carbonos terminales se conserva (Yamamoto y col., 1993).

Por otra parte, Shihata y Shah (2000), en un estudio la capacidad proteolítica de bacterias lácticas; realizado con nueve especies de *Streptococcus thermophilus*, seis de *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus*, catorce de *Lactobacillus acidophilus* y trece de *Bifidobacterium* ssp, observaron que, en cuanto a la capacidad para iniciar la primera etapa de la proteólisis (acción de proteinasas); todas las especies presentaron mayor actividad que bifidobacterias. Entre ellas, las más activas fueron algunas especies de streptococos. Estos resultados se pueden explicar por los requerimientos de acido glutámico y metionina (Glu y Met), que son cerca de 5 veces más y 60 veces más, respectivamente, que el contenido de estos aminoácidos libres en la leche (45 y <1 mg/mL respectivamente) (Juillard y col., 1995). Lo cual explica, en cierta forma la presencia de una proteinasa diferente a la PrtP, también agregada a la pared celular de *Streptococcus thermophilus* la PrtS, exclusiva de este microorganismo y que solo se activa cuando se encuentra en el medio concentraciones insuficientes de estos aminoácidos (Letrot y Juillard, 2001). De esta forma se tiene la secuencia prtS que codifica para la proteinasa que no tiene actividad en las fases iniciales de la proteólisis (Renault y col., 1996; Courtin y col., 2002). De igual manera, se han observado que esta proteinasa es necesaria en los sistemas de protooperación como en elaboración de yogurt (Courtin y col., 2002).

2.4.2. Productos de degradación de proteínas.

Los estudios de los productos resultantes de la acción de proteinasas, tienen que ver principalmente con la hidrólisis de proteínas de leche y principalmente de caseínas AS1CN y BCN, que son las que se encuentran en mayor proporción, ya que en un 80% estas proteínas son preferidas por las bacterias lácticas por sobre las proteínas del suero en un medio lácteo para iniciar la cascada de reacciones proteolíticas (Gasson y de Vos., 1994, Savijoki y col., 2005). En el caso de BCN, algunos estudios han revelado que la acción de PrtP, logra generar más de 100 oligopéptidos con tamaños de 4 a 30 residuos, sin tener indicadores de la existencia de di- y tri-péptidos pero si con concentraciones traza de fenilalanina. Muchos péptidos son generados de la la parte C-terminal de esta proteína, indicando que son derivados principalmente de la región 60-105 (Yamamoto y col., 1993; Kunji y col, 1995, Savijoki y col, 2005). En el caso de la KCN, los oligopéptidos se generan de la parte C-terminal de la región 96-106 (Kunji y col., 1996). Estas dos proteínas pueden ser degradadas por ambos tipos de PrtP, la PI y la PIII, sin embargo, en el caso de la degradación de las caseínas α solo puede llevarse a cabo por la proteinasa PIII y algunas proteinasas de especificidad intermedia entre PI y PIII, ya que la PIII es incapaz de hidrolizar ambas proteínas, la AS1CN y la AS2CN. Se han encontrado cerca de 23 oligopéptidos provenientes de la parte C-terminal de estas proteínas (Monnet y col., 1992).

En tanto la especificidad de la PrtS de streptococos, es intermedia a la de PI y PIII, pero con la particularidad que tiene afinidad por los tres tipos de caseínas (Fernandez-Espla y col., 2000), que lograron determinarlo por la secuencia de las regiones envueltas en la especificidad de sustrato. En este estudio se observó que la PrtS corta estructuras entre un aminoácido aromático en posición 1 (P1) y una prolina en posición 2 (P2), pero se inactiva cuando se encuentra un aminoácido cargado negativamente en posición 3 (P3). La secuencia Ala-Pro-Tyr que es la preferida de corte para las PI también fue la de mayor actividad para PrtS,

mientras que la Ala-Glu-Pro-Tyr-Phe que es más afin a PIII, fue pobremente degradada por PrtS. Pero en general la degradación de caseínas totales y de BCN fue similar (relación BCN/caseínas totales 0.8). Lo cual indica que igual que la PIII la PrtS, no tiene una preferencia marcada por BCN. Ahora bien, dependiendo de las condiciones de reacción (pH, concentración salina, etc.), la PrtS es capaz de hidrolizar laAS1CN en diferentes sitios del fragmento f(1-23), pero a pH altos 8, presenta las características de corte que presenta la PI a pH de 6 y a bajos pH cercanos a los pH de fermentación de queso (5.2) y de yogurt (4.0), los cortes son uno menos a los referentes observados en PIII, lo cual quiere decir que las características de corte de esta proteinasa, son un conjunto de características de PI y PIII (Exterkate y col 1993).

2.4.3. Sistema de transporte de aminoácidos y péptidos.

El segundo paso del sistema proteolítico, se resume al transporte de aminoácidos y péptidos al interior de la célula a través de la membrana celular. En este pasó esta inmerso una gran cantidad de subsistemas con especificidad única (Gasson y De Vos, 1994; Poolman y col., 1995; Kunji y col., 1996, Savijoki y col., 2005). En el caso de bacterias lácticas y particularmente en lactococos y lactobacilos, se han encontrado al menos 10 sistemas de transporte de aminoácidos que tienen alta especificidad por aminoácidos con estructuras similares ejemplo: Glu/Gln, Leu/Ile/Val, Ser/Thr, Ala/Gly, Lys/Arg (Kunji y col., 1996). Estos sistemas están regulados la hidrólisis de ATP (Glu/Gln, Asn y Pro/Gly (Poolman y col., 1995), otros motivados por protones (Leu/Val/Ile, Ala/Gly, Ser/Thr y Met), mientras el de Arg/Orn esta regulado por gradientes de concentración en un transporte pasivo (Savijoki y col., 2005).

En el caso de estreptococos, este sistema ha sido poco estudiado, dando paso a estudios generales y a profundidad sobre el transporte de oligopéptidos (Hols y col., 2005).

2.4.4. Sistema de transporte de di- y tri-péptidos.

Los estudios de transporte de di- y tri-péptidos hidrofílicos han demostrado que el mecanismo está regulado por fuerzas de protones, el cual se lleva a cabo por DtpT, que es una enzima perteneciente a una familia nueva de enzimas de sistemas de transporte de dipéptidos, llamadas familia-PRT. Se caracterizan, por solo permitir el transporte de di- y tri-péptidos de carácter hidrofílico, que no tienen nada que ver con algunas transportadoras de péptidos de otras bacterias que pertenecen a la familia de las ABC, las cuales necesitan de la hidrólisis de ATP, para su funcionamiento, esto reconocido por el análisis genómico de la secuencia codificante dtpP (Kunji y col., 1996).

En el caso de streptococos, se ha observado que hay un mecanismo reconocido para el transporte de glutamato, que no se ha encontrado en otras bacterias lácticas. Además que el transporte de di- y tri-péptidos es, igual que el de DtpT, protón-dependiente. Aunque, sin estudios estructurales de enzimas de transporte, se ha podido deducir, por medio de la secuenciación del genoma de algunas cepas de *Streptococcus thermophilus*, que hay una posible coexistencia de este tipo de enzimas protón dependiente, con algunas de la familia ABC ATP-dependientes, ya que la comparación de algunas secuencias que codifican para este tipo de enzimas en otros microorganismos se encontraron en el genoma de streptococos (Hols y col., 2005) las cuales son capaces de transportar péptidos hidrofóbicos, tal y como lo hacen la DtpP de lactobacilos y lactococos.

2.4.5. Sistema de transporte de oligopéptidos.

Se ha encontrado en estudios a nivel genético, que existe un sistema exclusivo de transporte de oligopéptidos (Opp), que junto con el sistema de proteólisis, probablemente son los más estudiados (Kunji y col., 1995). En estos estudios se sugiere que, pueden ser transportados al interior de la célula cadenas de hasta 10 aminoácidos. El sistema está compuesto de cinco proteínas (OppA, B, C, D y F) todas ellas pertenecientes al grupo ABC, que como se indicó

anteriormente son ATP-dependientes (Juille y col., 2005). De todas ellas OppA, es la encargada de ligar el sustrato.. Este sistema no ha sido caracterizado aún pero se sabe con certeza que es capaz de permitir el transporte de péptidos de hasta 12 unidades aminoacídicas (Lamarque y col., 2004).

En contraste el sistema de transporte de oligopéptidos de streptococos (Ami) es un sistema, capaz de permitir la entrada de péptidos con cadenas de 3 hasta 23 aminoácidos, lo cual genera un sistema más complejo (Juille y col., 2005) en el que se encuentran envueltas varias proteínas, con acciones similares a las del sistema Opp. Se le llamó así debido a la alta homología con el sistema Ami de *Streptococcus pneumoniae* (Hols y col., 2005) sin embargo, este sistema tiene dos proteínas ligadoras de oligopéptidos más, en un grupo de tres ATP-dependientes, asociadas a la membrana celular y que son las encargadas de encender el sistema de operón (AmiA1, 2, 3) esto lo hace un sistema mucho más eficiente de obtención de aminoácidos al interior de la célula, para subsanar la falta de una proteinasa tan eficiente como la PrtP de las otras bacterias lácticas (Fernandez-Espla y col., 2000). Se ha observado que, péptidos con cadenas acidas largas no pueden ser transportados por este sistema, mientras que los péptidos de cadenas entre 1000 y 3000 Da, péptidos con carga neta positiva y péptidos hidrofóbicos, son lo que más fácilmente son transportados (Juille y col., 2005). Al final el sistema se complementa con dos proteínas ligadas a la pared celular (AmiC y AmiD) que cuando se activa el operón, cambian de conformación para poder tener, no solo función estructural en la membrana si no también de permeasa, permitiendo el paso de los péptidos de cadenas de hasta 23 aminoácidos, lo cual lo hace un sistema muy eficiente, al atravesar la membrana celular en conformación α -hélice (Hols y col., 2005).

2.4.6. Peptidasas de bacterias acido lácticas.

Después del rompimiento primario de la PrtP seguido por el transporte de péptidos, estos últimos deben de ser seccionados más adelante por peptidasas.

Se han realizado diversos estudios que han permitido aislar e identificar ciertas enzimas participantes en este sistema, con ello se ha permitido conocer las secuencias codificantes para esas enzimas, su especificidad y sus características fisicoquímicas (Kunji y col., 2005).

Aminopeptidasa N. Es una metalopeptidasa monomérica de cerca de 95kDa. Se ha demostrado que la secuencia que codifica para esta enzima esta conservada en casi todas las bacterias ácido lácticas, la secuencia primaria de PepN de *Lb. helveticus* es 72% y 49% idéntica a la enzima de *Lb. delbrückii* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*, respectivamente (Tan y col., 1992; Klein y col., 1993 y Christensen y col., 1995). Es capaz de cortar aminoácidos del N-terminal en un amplio rango, tanto de tamaño como de composición. Su actividad está dirigida hacia oligopéptidos, aunque se ha observado que es incapaz de cortar dipéptidos que contengan prolina en cualquier posición, sin embargo si rompe tripéptidos que contengan este aminoácido en primera o segunda posición. La enzima de *L. lactis* muestra marcada preferencia por dipéptidos que contiene arginina en el residuo N-terminal, pero es capaz de hidrolizar péptidos que contengan lisina y leucina (Niven y col., 1995).

Aminopeptidasa C. La aminopeptidasa C (PepC) es en general, una tiol-peptidasa de cerca de 50 kDa en todos los organismos estudiados (Klein y col., 1993). Sin embargo se han reportado algunas diferencias con respecto a la estructura cuaternaria (tetramero contra hexámero). Se han establecido perfectamente preferencias en la hidrólisis de dipéptidos con Ala, Leu o Lys en posición n-terminal, en el mismo estudio se determinó que hexapéptidos no son hidrolizados por PepC (Kunji y col. 1996).

Tripeptidasas. Se han identificado dos peptidasas capaces de cortar tripéptidos en especies de *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*, pero no se han identificado en otras especies de bacterias ácido lácticas (Bosman y col., 1990). La PepT es una metalo-enzima y un homodímero de cerca de 105 kDa. La otra tripeptidasa es la peptidasa 53, es un trímero de 72 kDa, el cual es una tiol-enzima. Se ha encontrado que ambas tienen un pH óptimo diferente para la hidrólisis de Leu-Leu-

Leu, 7.5 y 5.8 para PepT y peptidasa 53 respectivamente. La especificidad de PepT es estrictamente limitada a tripéptidos y no se ha detectado actividad en di- u oligo-péptidos y al contrario de ello la peptidasa 53 tiene preferencia sobre los tripéptidos, pero es capaz de cortar di- y oligopéptidos, pero con baja actividad (Kunji y col., 1996).

Dipeptidasas. La dipeptidasa general (PepV) es una metalo-peptidasa monomérica de cerca de 51 KDa, con estructura cuaternaria bien definida la especificidad de esta dipeptidasa esta confinada única y exclusivamente a dipéptidos (Tan y col., 1995). Sin embargo ha sido muy difícil identificar a ciencia cierta dicha especificidad pero estudios han revelado que esta dipeptidasa es específica para péptidos con residuos hidrofóbicos en N-terminal y es nula para dipéptidos que contienen Pro, Gly o Asp (Tan y col., 1995).

1.4.7 Peptidasas de *S. thermophilus*.

Se ha asociado al sistema proteolítico de *S. thermophilus* 14 peptidasas diferentes, sin embargo solo cinco (PepC, PepS, PepN, PepO y PepX) han mostrado tener diferencias significativas con las encontradas en otros sistemas proteolíticos de bacterias lácticas (Rul y Monnet, 1997). La PepX que es una peptidasa de reciente descubrimiento (Anastasiou y col, 2002), la cual es específica para prolina sin importar el aminoácido adjunto (Deutsch y col., 2000). En comparación con otras bacterias lácticas, este sistema posee dos peptidasas adicionales (una oligopeptidasa y la aminopeptidasa PepS, esta última con gran afinidad por arginina o aminoácidos aromáticos en el extremo N-terminal (Fernández-Espla y Rul, 1999). La aminopeptidasa PepN de 97 kDa, pH óptimo de 7 y temperatura óptima de 37°C, es específica para aminoácidos hidrofóbicos en el extremo N-terminal (Rul y col., 1994) y para péptidos pequeños de 4 a 6 aminoácidos (Chavagnat y col., 1999); adicionalmente se ha encontrado una aminopeptidasa específica para lisina y leucina; es una metalopeptidasa de 90 a 100 kDa con pH óptimo de 6.5 y temperatura óptima de 35°C (Motoshima y col., 2003). La peptidasa PepC es una peptidasa similar a la de lactococos con especificidad para cisteína además de que no es capaz de liberar residuos de

prolina (Chapot-Chartier y col., 1994), estas dos características son las principales diferencias entre la PepC de otras bacterias lácticas; el pH óptimo es de 7 y la temperatura óptima es de 37°.

3. HIPÓTESIS, OBJETIVOS.

3.1. Hipótesis.

Durante el almacenamiento en refrigeración de leche fermentada por S. thermophilus y L. acidophilus hay un aumento en la concentración de péptidos de bajo peso molecular con carácter hidrofóbico, los cuales pueden ser péptidos biológicamente activos.

3.2. Objetivo general.

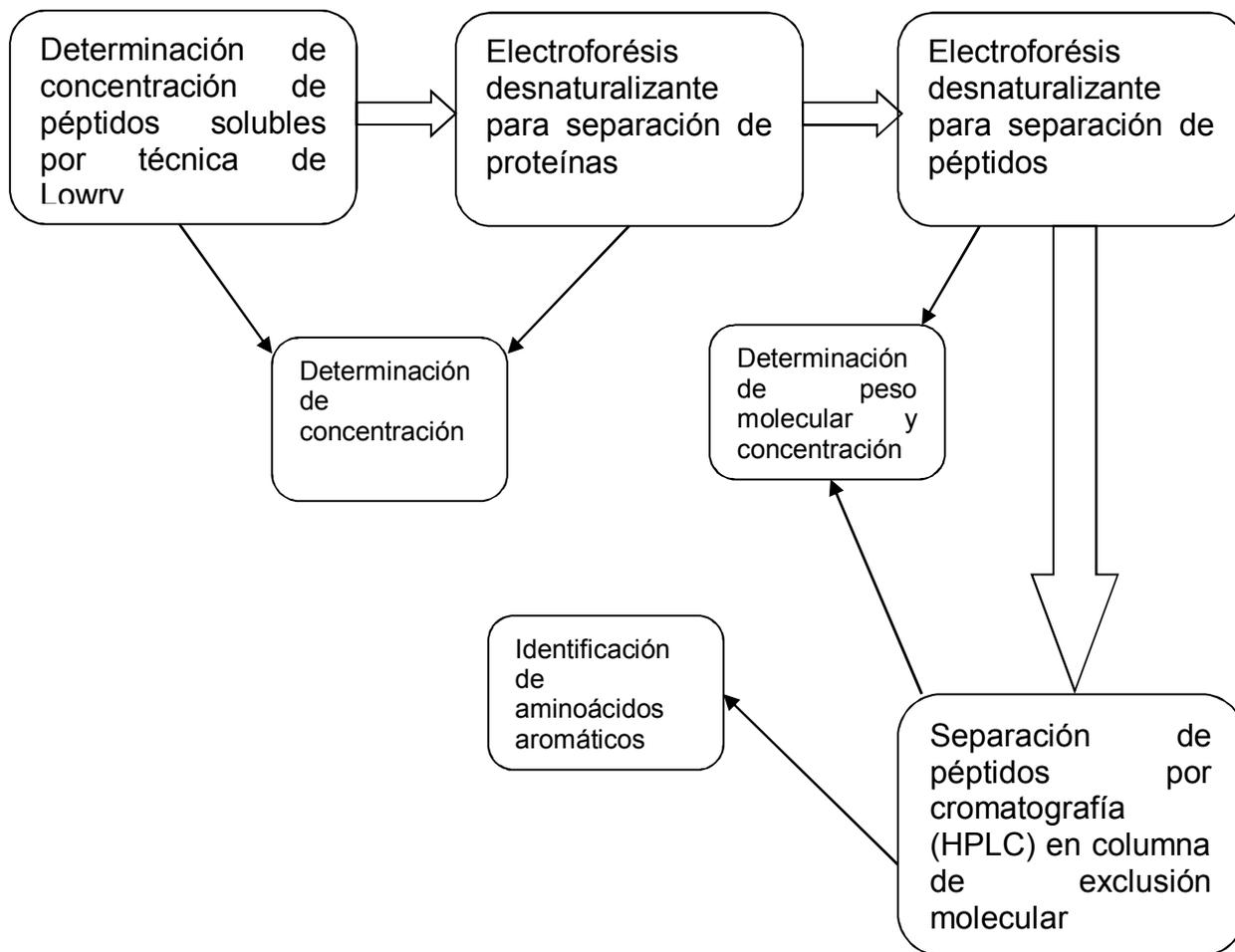
Separar e identificar los posibles péptidos bioactivos, monitoreando el proceso de liberación de péptidos durante almacenamiento en refrigeración de leche fermentada por S. thermophilus y L. acidophilus.

3.3. Objetivos particulares.

- ❖ Cuantificar el contenido de nitrógeno soluble por medio de la técnica de Lowry, durante el almacenamiento en refrigeración.
- ❖ Identificar la presencia de péptidos por medio del análisis de electroforesis desnaturizante.
- ❖ Cuantificar la formación de péptidos por electroforesis desnaturizante de péptidos
- ❖ Analizar por HPLC la leche fermentada durante el almacenamiento para calcular el peso molecular de los péptidos separados.
- ❖ De acuerdo a la comparación de los pesos moleculares reportados en la bibliografía establecer la posible bioactividad

4. METODOLOGÍA

4.1. Plan de trabajo.



4.2. Determinación de péptidos solubles. Método de Lowry

Con la finalidad de estandarizar la cantidad de proteína de cada una de las alícuotas, se utilizó la técnica de Lowry, (Lowry y col., 1951), la cual se basa en la reacción del péptido con Cu^{++} en condiciones alcalinas para formar Cu^+ (Reacción de biuret) y de la producción del ácido fosfomolibdato fosfotúngstico (reactivo de Folin) por aminoácidos aromáticos. La preparación de los reactivos se describe en el Apéndice 1.A.

4.2.1. Preparación de las muestras.

Se utilizaron dos muestras de una leche fermentada comercial (140 mL en envase PET) preparada con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus*, la muestra 1 con 15 días antes de caducar y la muestra 2 con 10 días antes de caducar. Se tomaron tres alícuotas de 5 mL de cada una de las muestras, en condiciones estériles, durante 15 días de almacenamiento en refrigeración a 4°C, en los siguientes tiempos: 1, 3, 5, 8, 10, 12 y día 15. El sobrante de la leche fermentada comercial se conservó en su envase original, tapando con cierre hermético estéril en cada toma de muestra. A los 5 ml de muestra se adicionaron 5 ml de ácido tricloro acético (TCA J.T. Baker, México) al 12% (p/v) para precipitar proteínas). La mezcla se centrifugó a 18000 rpm a 4°C. Los sobrenadantes se almacenaron en tubos de ensayo con tapa en congelación a -4°C, exceptuando la toma del día 15, ya que en este día se realizaron las mediciones correspondientes junto con los sobrenadantes de los demás días de muestreo, descongelados a temperatura ambiente.

4.2.2. Procedimiento

La técnica se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Se mezclaron 50mL de reactivo A más 1mL del reactivo B y 1mL del reactivo C (ver Apéndice 1.A).
2. Se tomaron 5 mL de la mezcla anterior y se adicionó 1 mL de las muestras preparadas.
3. Se dejó reposar diez min en la oscuridad.
4. Se agregaron 0.5 mL de reactivo D.
5. Se dejó reposar 30 min en la oscuridad.
6. Las muestras se leyeron en el espectrofotómetro (Shimadzu UV-160A) a una longitud de onda de 590 nm, contra un blanco de reactivos y agua.

La concentración de péptidos se determinó comparando las absorbancias contra una curva patrón de seroalbúmina (SA) con un intervalo de 0 a 500 $\mu\text{g}_{\text{SA}}/\text{mL}$, la gráfica se muestra en el apéndice 2.D.0.

$$P(\mu\text{g}_{\text{SA}}/\text{mL}) = (\text{Abs}_{\lambda,590} - 0.04351) / 0.002008$$

$$R = 0.9909$$

4.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La electroforesis es un método analítico semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, en función de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico, fue empleado por primera vez en el año 1937. Se emplean agentes reductores y SDS en la determinación del peso molecular de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS (García-Pérez, 2000).

4.3.1. Preparación de las muestras.

Se utilizó una muestra de leche fermentada comercial con 15 días antes de caducidad (140 mL en envase PET) preparada con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus*. Se tomó una alícuota de 5 mL de la muestra en condiciones estériles, durante 13 días de almacenamiento en refrigeración a 4°C, en los siguientes tiempos: 1, 3, 5, 7, 9, 11 y día 13. El sobrante de la leche fermentada comercial se conservó en su envase original, tapando con cierre hermético estéril en cada toma de muestra. Las muestras se almacenaron en tubos de ensayo con tapa en congelación a -4°C, exceptuando la toma del día 13, ya que en este día se realizó la electroforesis, junto con las muestras de los demás días, descongelándolos a temperatura ambiente. Una vez descongeladas, las muestras obtenidas homogenizaron por agitación. Se tomó una alícuota de 40 μL de cada uno de las muestras y se depositaron en viales de 1 mL, se

agregaron 20µL de buffer de corrida (Apéndice 1, C.6) con β-mercaptoetanol, se pusieron en baño maría en ebullición durante 5 min.

4.3.2. Procedimiento.

1. Se utilizó el equipo de electroforesis Mini-PROTEAN III cell (Bio Rad, Hercules, CA)
2. En un matraz Kitazato de 25mL se colocaron los volúmenes específicos de solución base de acrilamida, SDS y de buffer para preparar un gel de separación de 12.5% de T (Apéndice 1; C.1, C.4 y C.2). Se desgasificó durante 15 minutos con agitación suave. Se dejó polimerizar durante aproximadamente una hora.
3. Se preparó el gel de concentración a 4% de T, agregando los volúmenes correspondientes de solución base de acrilamida, SDS y buffer (Apéndice 1; C.1, C.4 y C.2). Se procedió a desgasificar igual que en el punto 2. Una vez que se adicionó esta solución, se colocaron los peines para formar los carriles de cada placa (frontal y posterior).
4. Una vez listo el gel, se instaló el equipo para correr las muestras.
5. Se pusieron 20 µL de cada muestra preparada, en cada uno de los carriles del gel y en cada gel se utilizó un estándar de peso molecular como referencia (Bio Rad, Hercules, CA).
6. Las muestras se corrieron por aproximadamente 1 hora (4°C) a 200 V hasta que el frente de migración de las bandas llegó casi al final del gel de separación.
7. Una vez que se terminó la corrida, se fijaron las proteínas y péptidos se fijaron en una solución de ácido acético al 7.5%, por 45 minutos.
8. Se hizo la tinción de las proteínas en el gel con Sypro Orange® (Bio Rad, Hercules, CA) por 30 minutos, se enjuagó el gel en agua desionizada.
9. Con el *software* Molecur Analyst de Gel-Doc se analizó la imagen del gel.

Para calcular el peso molecular de las proteínas y péptidos, se utilizó el patrón de amplio rango de pesos moleculares como patrón de peso molecular conocido, una preparación directa de proveedor (Bio Rad, Hercules, CA), las proteínas presentes en este patrón se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Patrón de amplio rango de pesos moleculares (Bio Rad, Hercules, CA).

PROTEÍNA	PESO MOLECULAR (Da)
Miosina	200,000
β-galactosidasa	116,250
Fosforilasa b	97,400
Seroalbúmina	66,200
Ovalbúmina	45,000
Anhidrasa carbonica	31,000
Inhibidor de tripsina	21,500
Lisozima	14,400
Aprotinina	6,500

A partir de la imagen obtenida de los geles se calculó el Rf de las bandas separadas. A partir de los Rf de cada uno de los péptidos teñidos, se realizó una extrapolación siguiendo la ecuación de la recta generada con el patrón de pesos moleculares y se construyó la gráfica de Rf contra log del PM del patrón de pesos moleculares de las proteínas y péptidos (Apéndice 2, D.1). La ecuación obtenida fue:

$$Rf = (\log PM - 5.2114) / -1.7512$$

$$R = 0.9459$$

Para la determinación de la concentración de proteínas, se tomó como referencia la BLG que se inyectó en una concentración de 1mg/mL. Con el *software* Molecur Analyst de Gel-Doc se determinó el área generada por las bandas de la separación de BLG en el gel. Las áreas calculadas de las proteínas se compararon con las de BLG, para determinar su concentración.

4.4. Separación de péptidos por electroforesis en gel de poliacrilamida TRICINA-SDS (Tricina-SDS-PAGE)

Este método es una modificación del sistema de la tricina-base de Schägger y von Jagow (1987) por que fue diseñado para la mejor resolución de proteínas de bajo peso molecular en un rango menor de 10 kDa.

4.4.1. Preparacion de las muestras.

Se utilizó una muestra de leche fermentada comercial con 15 días antes de caducidad (140 mL en envase PET) preparada con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus*. Se tomó una alícuota de 5 mL de la muestra en condiciones estériles, durante 13 días de almacenamiento en refrigeración a 4°C, en los siguientes tiempos: 1, 3, 5, 7, 9, 11 y día 13. El sobrante de la leche fermentada comercial se conservó en su envase original, tapando con cierre hermético estéril en cada toma de muestra. Las muestras se centrifugaron a 18000 rpm a 4°C. Los sobrenadantes se almacenaron en tubos de ensayo con tapa en congelación a -4°C, exceptuando la toma del día 13, ya que en este día se realizó la electroforésis, junto con los sobrenadantes de los demás días de muestreo, descongelándolos a temperatura ambiente. Una vez descongelados, los sobrenadantes obtenidos se homogenizaron por agitación. El sobrenadante se depositó en ampolletas para ser liofilizado a -50°C y con un vacío de 133×10^{-3} mbar en una liofilizadora Labconco DrySystem/Freezone 4.5. El liofilizado resultante se resuspendió en 100µL de agua desionizada, se tomó una alícuota de 40µL y se depositó en viales de 1mL, se agregaron 20µL de buffer de la muestra (Apéndice 1, B.4) con β-mercaptoetanol, se incubaron por 30 min a 40°C. Al término de la incubación se depositaron las muestras en cada uno de los carriles formados de los geles de acrilamida.

4.4.2. Procedimiento.

1. Se tomaron 4.73 mL de buffer de separación (pH 8.45) (Apéndice 1, B.3) y 3.23 mL de solución stock (Apéndice 1, B.1); junto con 160 μ L de SDS (Apéndice 1, C.4), se colocaron en un matraz Kitazato y se desgasificaron por 15 min, se adicionaron 35 μ L de persulfato de amonio al 10% (Apéndice 1, C.5) y 5 μ L de TEMED. Se agitó suavemente para homogenizar la solución. Inmediatamente después se colocaron en el equipo de electroforesis y se dejaron solidificar para la obtención de los geles.
2. Se colocaron 2 mL de agua desionizada, para que la superficie del gel quedara completamente plana al final de la polimerización (alrededor de 12 horas)
3. Una vez polimerizado el gel de separación, el gel de concentración se realizó de manera similar, en un matraz Kitazato se colocaron 0.32 mL de solución stock de acrilamida (Apéndice 1, B.1) y 3.68 mL de buffer a pH 8.45 (Apéndice 1, B.3), se adicionaron 50 μ L de persulfato de amonio al 10% (Apéndice 1, C.5) y 5 μ L de TEMED. Este gel fue colocado en la parte superior del gel de separación preparado previamente. Se dejó polimerizar por una hora.
4. Se removieron los peines y se montaron los cristales dentro de la cámara donde se llevó a cabo el paso de corriente.
5. Una vez asegurado que no existían fugas en la cámara, se adicionaron 300mL de buffer de corrida (1X) (Apéndice 1 B.5).
6. Se inyectaron las muestras, previamente preparadas en cada uno de los carriles.
7. Una vez colocadas las muestras en el gel se inició la corrida a 30 V hasta que las muestras entraron completamente al gel de separación (aproximadamente 1 h) se reguló el voltaje a 95V, hasta que el frente de migración llegó al final del gel, por un tiempo aproximado de 6-7h. Todo el proceso se llevó a cabo en baño de hielo.

8. Una vez terminada la electroforesis, para fijar los péptidos, los geles se sumergieron en una solución de 50% metanol, 10% ácido acético y 40 % agua desionizada (Apéndice 1 C.8), por una hora.
9. Al término de este tiempo se sumergieron en una solución de Sypro orange de Bio-Rad (5µL de sypro en 25mL de ácido acético 7.5%), por espacio de 30 min.
10. Los geles se sacaron de esta solución y se enjuagaron con agua desionizada, para tomar la imagen y analizarla en Gel-Doc 100 de Bio-Rad.

Para calcular el peso molecular de los péptidos, se utilizó el patrón para polipéptidos (Bio Rad, Hercules, CA), las proteínas presentes en este patrón se muestra en la Tabla 2

Tabla 2. Pesos moleculares de los péptidos del patrón de pesos moleculares para polipéptidos (Bio-Rad)

PROTEÍNA	PESO MOLECULAR (Da)
Triosafofato isomerasa	26,625
Mioglobina	16,950
α-lactoalbúmina	14,437
Aprotinina	6,512
Insulina b, oxidada	3,496
Bacitracina	1,423

A partir de la imagen del gel obtenida en el GelDoc de (Bio-Rad) se calculó el Rf de las bandas separadas. Se calculó el Rf de cada uno de los péptidos, se construyó una grafica siguiendo la ecuación de la recta generada con los datos obtenidos a partir del patrón de pesos moleculares. La gráfica de Rf contra log del PM del patrón de pesos moleculares, se encuentra en el Apéndice 2, D.2. A partir de esta gráfica se generó la siguiente ecuación:

$$R_f = (\log PM - 1.9881) / -0.3574$$

$$R = 0.929$$

Para la determinación de la concentración de péptidos, se tomó como referencia la BLG que se inyectó, 1mg/mL. Con el *software* Molecular Analyst de Gel-Doc se determinó el área generada por las bandas de la separación de BLG en el gel. Las áreas calculadas de cada péptido se compararon con la de la BLG, para determinar su concentración.

4.5. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Las columnas de HPLC más utilizadas en la separación de péptidos se limitan a tres: separación utilizando (i) la diferencia de tamaño (HPLC por exclusión de tamaño o SEC-HPLC), (ii) carga neta (HPLC de intercambio iónico o IEC-HPLC) o (iii) hidrofobicidad (HPLC en fase reversa o RP-HPLC); esta última la más usada de las tres en la actualidad. La capacidad de estas técnicas para separar péptidos de estructuras muy parecidas, hacen que su combinación sea una herramienta muy poderosa en la identificación de fracciones en una mezcla compleja. Adicional a ello la detección por rayos ultra violeta (UV) a diferentes longitudes de ondas permiten la obtención de resultados útiles en la identificación de moléculas.

4.5.1. Preparación de las muestras

Se utilizó una muestra de leche fermentada comercial con 15 días antes de caducidad (140 mL en envase PET) preparada con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus*. Se tomó una alícuota de 5 mL de la muestra en condiciones estériles, durante 13 días de almacenamiento en refrigeración a 4°C, en los siguientes tiempos: 1, 3, 5, 7, 9, 11 y día 13. El sobrante de la leche fermentada comercial se conservó en su envase original, tapando con cierre hermético estéril en cada toma de muestra. Las muestras se centrifugaron a

18000 rpm a 4°C. Los sobrenadantes se almacenaron en tubos de ensayo con tapa en congelación a -4°C, exceptuando la toma del día 13, ya que en este día se realizó el análisis, junto con los sobrenadantes de los demás días de muestreo, descongelándolos a temperatura ambiente. Una vez descongelados, los sobrenadantes obtenidos se homogenizaron por agitación. Los sobrenadantes se depositaron en ampollitas para ser liofilizados a -50°C y con un vacío de 133×10^{-3} mbar en una liofilizadora Labconco DrySystem/Freezone 4.5. El liofilizado resultante se resuspendió en 100µL de agua desionizada.

4.5.2. Exclusión molecular (SEC-HPLC)

Para la separación de los péptidos por SEC-HPLC, se utilizó una columna de exclusión de tamaño (Biosep-SEC 2000, Phenomenex®, tamaño de partícula 5 µm, tamaño de poro 145 Å, 300 x 7.8mm). Se utilizó como fase móvil un buffer de fosfatos 6.8. Se inyectaron 40 µL de muestra, del centrifugado preparado de la leche fermentada, al HPLC. Se corrió a temperatura ambiente, con una tasa de flujo de 1 mL/min., durante 60 min. Se inyectaron todas las muestras de todos los días correspondientes al almacenamiento refrigerado.

Para la determinación de los pesos moleculares, se realizó por medio de la construcción de una curva patrón, con un estándar de pesos moleculares conocidos de Bio-Rad junto con un aminoácido aislado.

Tabla 3. Pesos moleculares de los péptidos del patrón de pesos moleculares de péptidos para separación por HPLC en columna de exclusión molecular

PROTEÍNA	PESO MOLECULAR (Da)
Triosafosfato isomerasa	26,625
Mioglobina	16,950
α -lactoalbúmina	14,437
Aprotinina	6,512
Insulina b, oxidada	3,496
Bacitracina	1,423
Acetil-pentafenilalanina	1,035
N-acetil-D-triptofano	257

La gráfica de tiempo de retención (Rf) contra log del PM del patrón de pesos moleculares, se observa en el Apéndice 2, D.3. La ecuación que se obtuvo a partir de esa gráfica es la siguiente:

$$R_f = (\log PM - 51.908) / -0.0012$$

$$R = 0.8842$$

Para la determinación de la concentración de las fracciones peptídicas, se realizó una curva patrón con N-acetil-D- triptófano en las siguientes concentraciones: 5, 10, 12.5, 15, 20 y 25 $\mu\text{g/mL}$. La grafica se encuentra en el apéndice 2 y se obtuvo la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración } (\mu\text{g/mL}) = (\text{área} - 693920) / 0.607042$$

$$R = 0.9887$$

La detección de las fracciones peptídicas se llevó a cabo por medio de un detector de arreglo de diodos, tomando lecturas a 210 nm para determinar enlaces

peptídicos, 257 nm, para la identificación de péptidos con fenil-alanina en su cadena y a 280 nm para la determinación de tirosina y triptófano en la cadena peptídica.

4.6. Análisis estadístico.

Todos los experimentos que se realizaron por triplicado y los datos experimentales se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), se hizo la comparación de medias por el método de Tukey's con un nivel de significancia de 0.05. Se utilizó el programa SPSS Statistics 17.0 (1993-2007 Polar Engineering and Consulting).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Determinación del contenido de péptidos solubles por el método de Lowry.

Con la finalidad de determinar si se alcanzaba un máximo de producción de péptidos, se analizaron dos muestras de la leche fermentada comercial (*L. acidophilus* y *S. termophilus*) con diferente fecha de caducidad; el análisis se hizo por triplicado. Como se puede verificar en la gráfica (Fig. 2), la concentración de péptidos tuvo un comportamiento que ya se había observado en estudios anteriores, para otras leches fermentadas (González-Olivares, 2004).

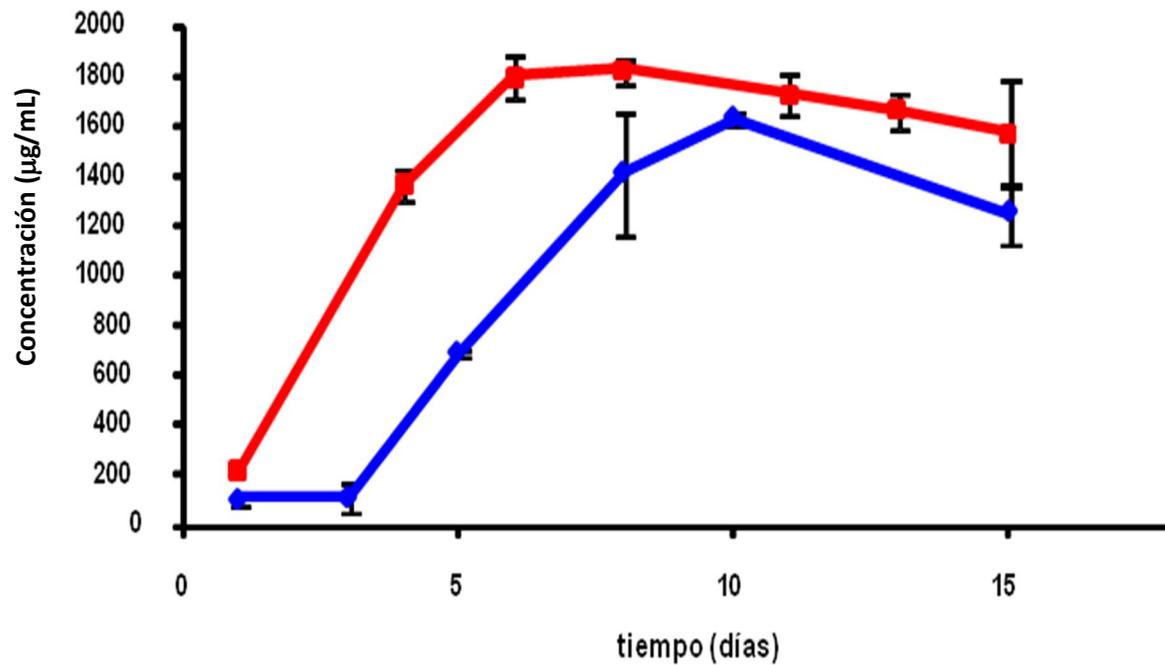


Fig. 2. Cinética de producción de péptidos solubles durante el almacenamiento a 4 °C en la leche fermentada comercial. Muestra 1 (15 días antes de caducidad); muestra 2 (10 días antes de caducidad)

Hay un claro ascenso en la concentración de péptidos en el día 3 del almacenamiento refrigerado para la muestra 2, este comportamiento se presentó de acuerdo a la fecha de caducidad del producto. En los primeros días de fabricación del producto (15 días antes de su fecha de caducidad) podemos observar que esta tendencia se vio hasta el día 5 del almacenamiento. Después de este tiempo la concentración de péptidos se mantiene en una concentración estable, en cuanto llega a un máximo, para mantenerse constante ($p \geq 0.05$).

Algunos autores han determinado que se puede mantener una concentración estable debido a que, algunas peptidasas realizan un trabajo de corte sin afectar la concentración de los péptidos solubles, si no solo el tamaño de los ya acumulados.

Nighswonger y col. (1996) observaron que, aún en refrigeración a 4°C por 10 días, la cantidad de unidades formadoras de colonias (ufc) en leches fermentadas no decrece sino que se mantiene constante después de alcanzar un máximo, esto puede explicar el comportamiento al final del estudio de la producción de péptidos solubles en la leche fermentada comercial (Nighswonger y col., 1996; Donkor y col., 2007c). Algunos autores han determinado que la acumulación de péptidos con Ser y Pro, pueden inhibir el crecimiento de bacterias lácticas (Gilbert, y col., 1997) pero al mismo tiempo se ha observado que la actividad enzimática no se detiene debido a lisis celular (Poolman y col., 1995; Law y Haandrikman, 1997) manteniendo la acumulación de péptidos de distintos pesos moleculares.

Si observamos la concentración de péptidos solubles alcanzada en la leche fermentada comercial durante el almacenamiento en refrigeración, podemos decir que esta directamente relacionada a la acumulación debida a la actividad proteolítica, de acuerdo con los estudios de varios autores, que han reportado que la actividad proteolítica durante la fermentación del producto y durante el almacenamiento en frío, está íntimamente ligada a la acumulación de péptidos de diferente peso molecular, que es dependiente del microorganismo presente en el medio (Matar y col., 1997; Clare y Swaisgood, 2000). En el presente estudio la acumulación de oligopéptidos (más de 13 unidades aminoacídicas) es menor que la acumulación de los péptidos de peso molecular debajo de 4.kDa, ya que el sistema proteolítico de *S. thermophilus* cuenta con un sistema de transporte de oligopéptidos, que puede permitir el paso de péptidos de más de 20 unidades aminoacídicas, principalmente provenientes del rompimiento primario de caseínas y en menor grado de β -lactoglobulina. En el caso de *L.acidophilus* este sistema

cuenta con el transporte de oligopéptidos con cadenas no mayores a 13 unidades aminoacídicas, es por ello que se puede decir que esta acumulación es, en un principio, debida a producción de péptidos de bajo peso molecular, que además pueden ser péptidos con una estructura primaria muy diversa (Poolman y col., 1995; Kunji y col., 1996). Por otro lado, se ha reportado que pueden alcanzar concentraciones suficientes para permitir un beneficio fisiológico directo (Rokka y col., 1997; Meisel, 1998; Meisel, 2001; Clare y Swaisgood, 2000; Hartmann y Meisel, 2007). La repetibilidad de los datos obtenidos, en esta parte de la investigación, comparados con los datos reportados en trabajos anteriores (González-Olivares 2004) determina, de manera muy cercana, que se alcanza un máximo de concentración de péptidos siempre dependiente de la concentración de proteínas en el medio (caseínas y proteínas del suero) y del microorganismo presente en la leche fermentada, donde la mayor diversidad de péptidos se encontró en una leche fermentada con *L. acidophilus* y *S. thermophilus*, pero la mayor concentración se observó en una bebida láctea fermentada con *L. casei* y *S. thermophilus*, que a su vez tenía una concentración de leche superior al 15%.

5.2. Separación de proteínas de la leche fermentada por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Para la determinación de los cambios en la concentración de caseínas durante la cinética de refrigeración, se realizó una electroforesis desnaturizante (SDA-PAGE) (Fig.3).

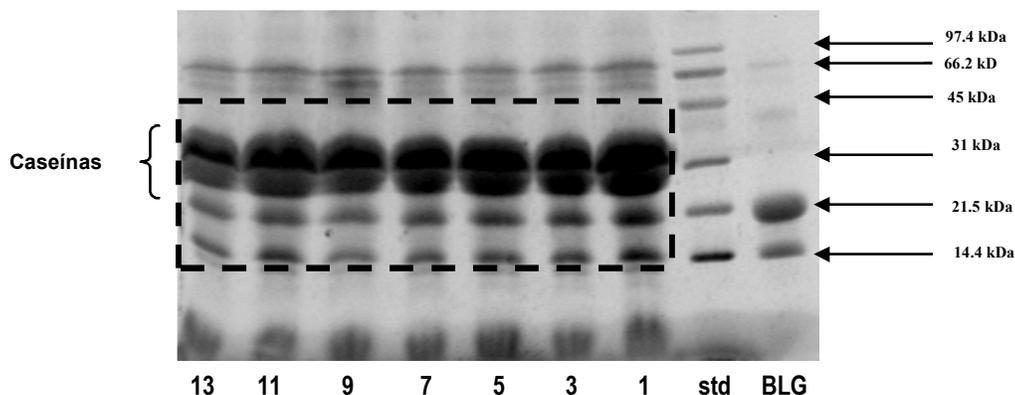


Fig. 3. Cambios en la concentración de proteínas de la leche fermentada comercial durante la refrigeración a 4°C en un gel de electroforesis de poliacrilamida-SDS desnaturizante. BLG (β -lactoglobulina); std (patrón de pesos moleculares); día 1 (1); día 3 (3); día 5 (5); día 7 (7); día 9 (9); día 11 (11); día 13 (13).

Esta técnica se ha utilizado de manera histórica para la separación de proteínas, que en nuestro caso además de separarlas, se utilizó como un método cuantitativo y para poder determinar su concentración a lo largo de la cinética de refrigeración. La concentración de proteína, en cada uno de los carriles del gel, se estandarizó para que el análisis fuera independiente de la concentración de proteína total. Podemos observar en la imagen que la concentración de caseínas se encuentra en claro descenso del mismo modo que la concentración de BLG. De igual manera en el extremo final del gel de electroforesis, podemos observar acumulación de una fracción protéica debajo de la banda de la ALA que, debido al peso molecular, se determina que se trata de péptidos, los cuales se incrementan a lo largo de la cinética de refrigeración.

Se determinó que la concentración de caseínas al inicio del monitoreo era de 5.2 mg/mL mientras que al final del estudio disminuyó hasta 2.9 mg/mL. Considerando que la mayor acumulación de péptidos se genera a partir de la estructura primaria de las caseínas, es posible establecer una relación entre la acumulación de péptidos en el medio y la disminución de la concentración de caseínas. Se sabe que la fuente de nitrógeno de las bacterias ácido lácticas proviene de la degradación de las caseínas (Gasson y de Vos, 1994; Savijoki y

col., 2005). Sin embargo, aún cuando el proceso de fermentación ha finalizado durante la fabricación de la leche fermentada, las bacterias lácticas mantienen actividad proteolítica o al menos las enzimas asociadas a su sistema proteolítico ya sea por actividad microbiana inherente al sistema proteolítico o por lisis celular, ya que al sufrir un rompimiento de membrana, las enzimas intracelulares continúan en actividad (Nighswonger y col., 1996; Donkor, 2007b). Por otro lado en un estudio realizado en leches fermentadas almacenadas en refrigeración, se ha reportado que las bacterias ácido lácticas tienen actividad proteolítica (Nielsen y col., 2009). De la misma manera Donkor y col. (2007c) han observado que el aumento en la concentración de péptidos se presenta entre la semana 1 y 3 de almacenamiento, inmediatamente después del final del proceso de fermentación, lo cual coincide perfectamente con los resultados obtenidos en la electroforesis.

En el caso de las principales proteínas del suero, es muy claro observar en la imagen que la concentración de BLG disminuye no en la misma proporción que disminuye la concentración de las caseínas, pero sí en mayor proporción que la disminución de la concentración de la ALA, esto puede ser debido en primera instancia a que, de las proteínas del suero esta es la primera en degradarse, por el sistema proteolítico de bacterias lácticas, debido al contenido de prolina en la estructura primaria de la BLG que es cuatro veces mayor que en ALA, que es el aminoácido de especificidad de las enzimas del sistema proteolítico (Poolman y col., 1995; Savijoki y col., 2005).

En estudios relacionados con la obtención de aminoácidos a través del rompimiento de proteínas como caseínas y proteínas del suero, se ha establecido que este mecanismo está definido como un sistema en cascada, que tiene que ver con el rompimiento primario de la cadena aminoacídica de proteínas por medio de las peptidasas asociadas a la pared celular de las bacterias ácido lácticas, las cuales al ser serino-proteinasas prolino específicas llevan a cabo el rompimiento en puntos específicos de esta estructura primaria, para dar paso a la acción de las endopeptidasas que al hacer el trabajo de corte generan oligopéptidos de tamaño

variable, pero en general mayores de 20 aminoácidos, a partir de este momento estos péptidos pueden entrar por dos vías, transporte pasivo que generalmente se da de manera inmediata en *S. thermophilus*, ya que esta bacteria es capaz de transportar péptidos de hasta 23 aminoácidos (Fernández-Espla y Rul, 1999; Garault y col., 2001) mientras que en el caso de otras bacterias lácticas este transporte está supeditado a que se genere un nuevo rompimiento por aminopeptidasas (Dave y Shah, 1998; Gomes y col., 1998) para poder transportar oligopéptidos de menor peso molecular generalmente cadenas no más largas de 13 aminoácidos. Este nuevo rompimiento genera péptidos de menor peso molecular o deja aminoácidos libres, que al no tener en su estructura primaria aminoácidos esenciales para esa bacteria o no ser un aminoácido esencial, se quedan libres en el medio igual que lo hacen péptidos de peso molecular intermedio o de alto peso molecular (Akpemado y Bracquart, 1983). El segundo sistema de transporte tiene que ver con un transporte con gasto de energía que solo se produce si la bacteria es incapaz de generar ese aminoácido en particular a través de un mecanismo de metabolismo de aminoácidos, integrado al mismo sistema proteolítico, regulado por operones (Garault y col., 2000).

En el gel de electroforesis desnaturalizante, fue posible determinar los cambios en las concentraciones tanto de caseínas, de las principales proteínas del suero, en particular ALA y BLG, así como la de péptidos totales. Aún cuando es evidente el aumento en la concentración de péptidos durante el almacenamiento en refrigeración, fue necesario realizar electroforesis específica para la separación de péptidos, para cuantificar la concentración y determinar el peso molecular aproximado de cada uno de los péptidos presentes en el sistema.

5.3. Separación de péptidos por electroforesis en gel de poliacrilamida Tricina-SDS (Tricina-SDS-PAGE)

Para caracterizar los péptidos liberados durante la cinética de refrigeración, se realizó la electroforesis para péptidos (Schägger y von Jagow, 1987) las muestras se tomaron en los días 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13. La imagen del gel (Fig 4) se

utilizó para determinar el peso molecular y la concentración de los péptidos en la leche fermentada. Se encontraron bandas correspondientes a péptidos menores a 1.4 kDa que corresponde al peso de la última banda del STD y algunos otros menores de 14.4 kDa, peso correspondiente al de la ALA. Considerando que muchos de los péptidos con funciones bioactivas que se encuentran reportados en la bibliografía son menores al peso de esta proteína (Clare y Swaisgood, 2000; Hartmann y Meisel, 2007) cabe la posibilidad de que en alguna de estas bandas se encuentre algún péptido bioactivo.

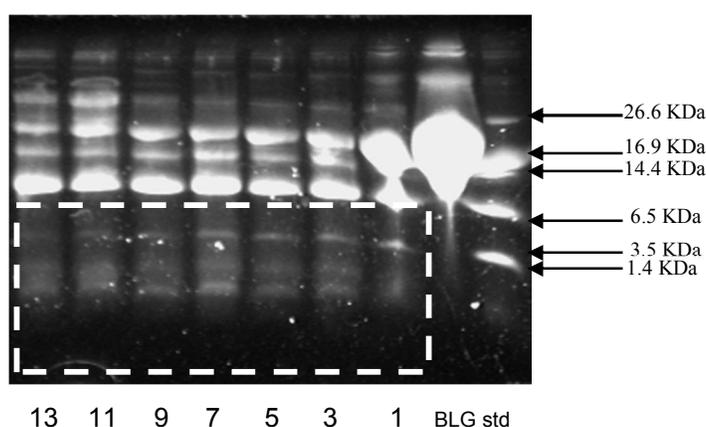


Fig. 4. Péptidos presentes en leche fermentada comercial almacenada en refrigeración. Gel de poliacrilamida-Tricina-SDS. BLG (β -lactoglobulina); std (patrón de pesos moleculares); día 1 (1); día 3 (3); día 5 (5); día 9 (9); día 11 (11); día 13 (13).

Al analizar las bandas generadas en el gel de electroforesis se encontró una acumulación de dos péptidos, a través del almacenamiento en refrigeración, con un peso molecular de 1.4 kDa y uno menor a 1.4 kDa (Fig. 4). La aparición y acumulación de estos péptidos, corresponde con el mecanismo de degradación de proteínas para la formación de péptidos expuesto por Gasson y de Vos, (1994) quienes encontraron una formación de péptidos de bajo peso molecular por medio de este efecto. Al igual que se observó en la SDS-PAGE, en el gel de Tricina-SDS-PAGE, se observa una disminución en la concentración de las proteínas de peso molecular mayor a 14.4 kDa, con las bandas de menor intensidad al paso de los días del estudio, las bandas más representativas son las correspondientes a

BLG y ALA. Las caseínas no se observan en este estudio ya que las muestras fueron centrifugadas antes de ser utilizadas para el análisis.

5.4. Análisis de concentración de proteínas y péptidos.

Las áreas de las bandas generadas en el gel de electroforesis para el análisis de péptidos (Fig. 4), se analizaron por la absorción de luz, con la ayuda del programa integrado al GelDoc de Bio-Rad, Molecular Analyst. De esta manera fue posible calcular el cambio en las concentraciones de las proteínas y de los péptidos durante el almacenamiento. Se utilizó una solución patrón de BLG de concentración conocida (200 $\mu\text{g/mL}$), con este patrón de referencia se realizó el cálculo de concentración de las muestras analizadas de acuerdo a las áreas obtenidas durante el análisis en el Gel-Doc. Los resultados obtenidos mostraron que, la aparición de péptidos en el medio, obedece a un rompimiento de la estructura primaria de las proteínas, tanto de suero como de caseínas, partiendo del hecho de la caída en la concentración de las proteínas al mismo tiempo del aumento gradual, a través de la cinética de refrigeración, de péptidos de diferente peso molecular. Se observa en la gráfica de la Fig. 5 un decremento en la concentración de todas las proteínas monitoreadas, esta concentración se mantiene en decremento constante, disminuyendo la velocidad a partir del día 7 en todas las proteínas.

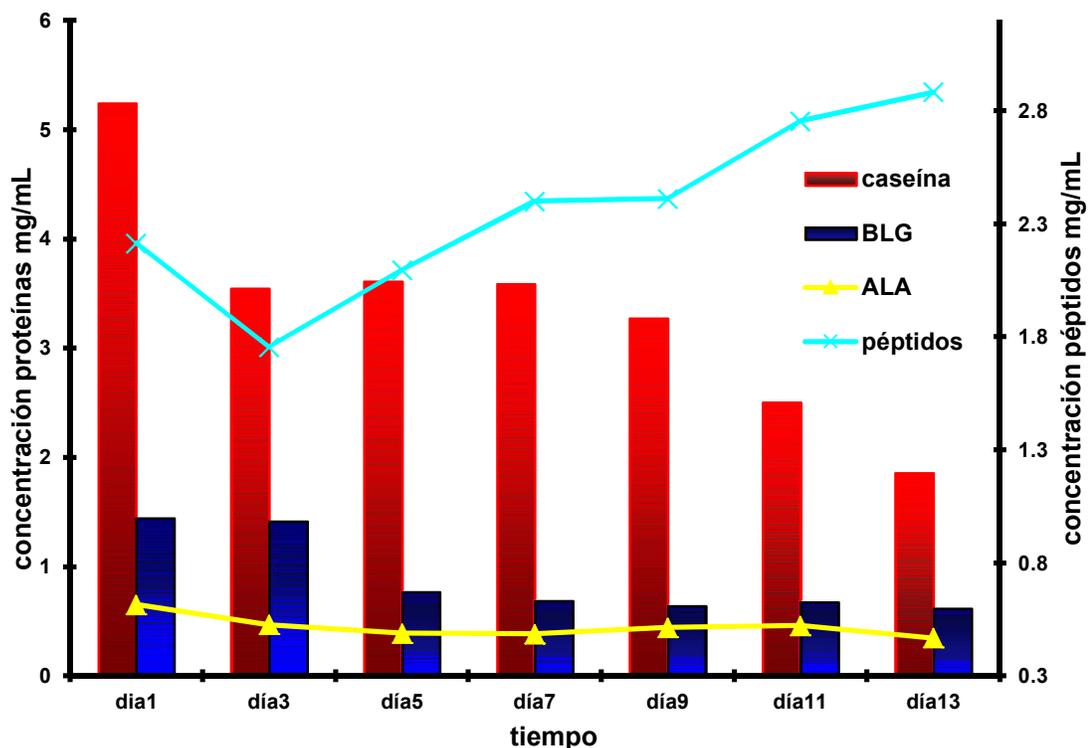


Fig. 5. Evolución de la concentración de la ALA, la BLG y de las caseínas, así como de la formación de péptidos en la leche fermentada comercial, durante 13 días en refrigeración a 4°C.

Se ha observado que la actividad proteolítica de las bacterias lácticas continúa y se mantiene activa aún después del proceso de elaboración y en refrigeración a 4°C (Donkor y col., 2007b; Nielsen y col., 2009) aunque es importante destacar que esta actividad no se ve nulificada aún en congelación, donde, a pesar de que algunas proteasas y peptidasas tienen temperatura óptima de 25-37°C, la actividad continúa en estos dos rubros, tanto de hidrólisis de proteínas como de péptidos (Juille y col., 2005). Autores como Rokka y col., (1997); Meisel, (1998); Clare y Swaisgood, (2000) y Ortiz-Chao, (2009), han destacado que el origen de péptidos provenientes de proteínas del suero, es en general de mayor importancia en BLG, este origen probablemente debido a las características de su estructura primaria ya que en la BLG se tienen 8 prolina mientras que en la ALA solo dos, y tomando en consideración que las proteinasas y peptidasas del sistema proteolítico de bacterias lácticas son prolino-específicas

(Kunji y col., 1996; Savijoki y col., 2005), esta sería una de las razones del origen de péptidos en el medio de fermentación. Mientras que en la BLG la concentración disminuyó de 1.4 a 0.6 mg/mL, la de ALA reflejó un decremento menor de 0.4 a 0.2 mg/mL. Por otro lado en las caseínas se continúa con un patrón de decremento desde el día 1 hasta el día 13, presentando un decremento de 5.2 a 1.8 mg/mL, este decremento más pronunciado puede obedecer a las mismas razones presentadas en el caso de las proteínas del suero, que es la cantidad de prolínas en su estructura primaria. En este caso específico, los péptidos bioactivos provenientes de caseínas, principalmente se originan de BCN, que presenta 35 prolínas, mientras que las demás presentan menos de 20 (20 KCN, 17 As1CN y 10 As2CN) de estos datos deriva la importancia de la presencia de caseínas en el medio ya que además de originar la mayor concentración de péptidos bioactivos, también generan la mayor parte de péptidos tanto opioides como anti-hipertensivos, que son los péptidos bioactivos más importantes (Meisel, 1998; Meisel y Fitzgerald, 2000; Smacchi y Gobetti, 2000; Steijns, 2001; Hartmann y Meisel, 2007) tanto por su concentración en leches fermentadas como por su acción fisiológica.

La concentración de péptidos alcanzó un máximo de 2.8 mg/mL en el último día del monitoreo. La gráfica de concentración de péptidos muestra que a partir de una concentración inicial de cerca de 2.4 mg/mL, se generó un decremento (hasta 1.8 mg/mL). Después de este día se observó un ligero aumento (1.9 mg/mL) en el día 5 y siguió su ascenso hasta llegar al máximo. Este descenso en los primeros días de almacenamiento pudo deberse a que se formaron péptidos más pequeños a partir de los péptidos formados de la fermentación por acción de las endopeptidasas de las BAL. Gasson y de Vos, (1994) describieron un mecanismo de cascada en el sistema proteolítico de BAL para la formación de péptidos y aminoácidos libres.

La concentración de péptidos siguió aumentando después del día 13, mientras que la de proteínas del suero permaneció constante, esto debido a que

estos péptidos seguramente se generaron de caseínas, ya que las bacterias lácticas hidrolizan con más frecuencia BCN y ACN según Gasson y de Vos, (1994).

La determinación de pesos moleculares se llevó a cabo por medio del cálculo del Rf de cada una de las bandas observadas en el gel de la Fig. 4, con el programa integrado a Gel Doc de Bio Rad, Molecular Analyst. Se generó una curva para el patrón de pesos moleculares con los Rf de cada uno de los péptidos y el logaritmo del peso molecular de las bandas del patrón.

En el primer día de monitoreo se identificaron 12 péptidos menores a 14.4 kDa y se observó que aún cuando la concentración de péptidos, fue mayor en el día 1 que en los días cuatro y seis, la variedad de estos no fue la mayor en este día; en el día 3 se encontraron 17 péptidos y 16 en el sexto día. La cantidad de péptidos empezó a decrecer en los días subsiguientes, ascendió en el día 13 y en este día alcanzó el máximo (18 péptidos). En el día 13 del monitoreo aparecieron péptidos que no se habían observado en otros días. Es importante destacar que en este día es donde se encontró mayor cantidad de péptidos nuevos, por ello se puede pensar que esta generación se debió a la acción de aminopeptidasas específicas, ya que igual que en el apartado anterior, podemos decir que la viabilidad de las bacterias se pudo conservar aún en refrigeración. Nighswonger y col., (1996) determinaron que la viabilidad de algunas especies de *Lactobacillus* se conservaba aún después de 20 días de almacenamiento a 4°C, con resultados similares se concluyó la supervivencia de bacterias lácticas en yogurth comercial en condiciones similares de almacenamiento refrigerado (Donkor y col., 2007a). Otros autores como Vinderola y col., (2002), realizaron estudios con seis bacterias probióticas para observar su interacción en leches fermentadas cuando se colocaban en el mismo medio, y observaron que una de las interacciones más positivas (sin inhibición), en almacenamiento a 4°C, fue la que guardaban algunas cepas de *S. thermophilus* y *L. acidophilus*, midiendo los cambios de producción de péptidos, durante la fermentación, al mismo tiempo que se determinó la

viabilidad de bacterias en el medio. Otro factor que pudo estar relacionado con este efecto es el que se produce por la autólisis de las bacterias, que al liberar proteasas internas al medio pudieron hidrolizar péptidos de alto peso molecular. Nighswonger y col., (1996) también describen que, en su estudio, hubo bacterias que no sobrevivieron al almacenamiento y sufrieron autólisis, este efecto descrito de manera similar en un estudio reportado por Donkor y col., (2009c), en el cual se encontró acumulación de péptidos en refrigeración a 4°C por 4 semanas en una leche fermentada comercial infiriendo este efecto tanto a la viabilidad de bacterias láctica, como a la acción de enzimas libres.

Esto se ve apoyado con el hecho de que hubo péptidos que aparecieron en ciertos días (día 1, 3, 11 etc.). Se encontró un péptido de 10.5 kDa que apareció en el día uno y después no se volvió a encontrar, hasta el día 9. Aun más interesante resulta el hecho de que, en los días cuatro y once, apareció un péptido de 8.1 kDa que no se encontró en otros días ni en días subsiguientes; por ello es posible establecer que este péptido podría ser el resultado de la hidrólisis del primero.

Se encontraron dos péptidos que se mantuvieron presentes hasta el día trece con un peso de 1.4 y de 1.2 kDa. Estos péptidos pueden estar relacionados con algún péptido bioactivo, debido a su peso molecular. Muchos autores han reportado péptidos de menos de 2 kDa biológicamente activos (Rokka y col., 1997; Meisel, 1998; Clare y Swaisgood, 2000; Meisel, 2001).

En la grafica de péptidos de pesos moleculares mayores a 5 kDa (Fig. 6), se encontró un péptido de 9.2 kDa que se generó en el día 3, tuvo un incremento de concentración en el día 6, para disminuir su concentración en el día 13. En general se observó que los péptidos de este grupo se generaban para desaparecer en los días posteriores o aparecer de nuevo después.

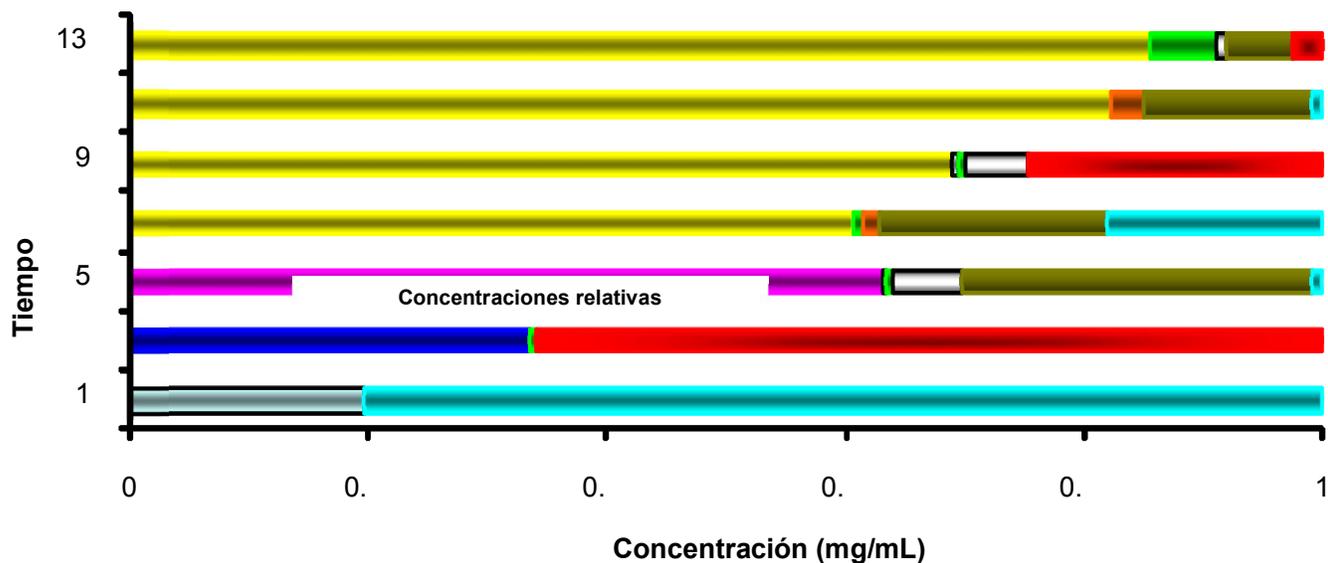


Fig. 6. Concentración relativa de péptidos mayores a 5 kDa presentes en la leche fermentada comercial durante 13 días en refrigeración a 4°C. Pesos moleculares expresados en kDa

Algunos péptidos de peso molecular intermedio (de 2 a 5 kDa) se generaron al mismo tiempo que desaparecieron o disminuyeron de concentración los péptidos mayores a 5 kDa (Fig. 7), como en el caso de los péptidos de 4.5 y de 2.5 kDa, los cuales se mantuvieron después de su aparición, hasta el final del almacenamiento en refrigeración. Otros péptidos de este grupo se generaron, y de forma similar que los péptidos de más de 5 kDa en días posteriores a su aparición, mostraron una tendencia de disminución de concentración como en el caso del de 4.2, el de 3.5, el de 2.3 y el de 2.0 kDa.

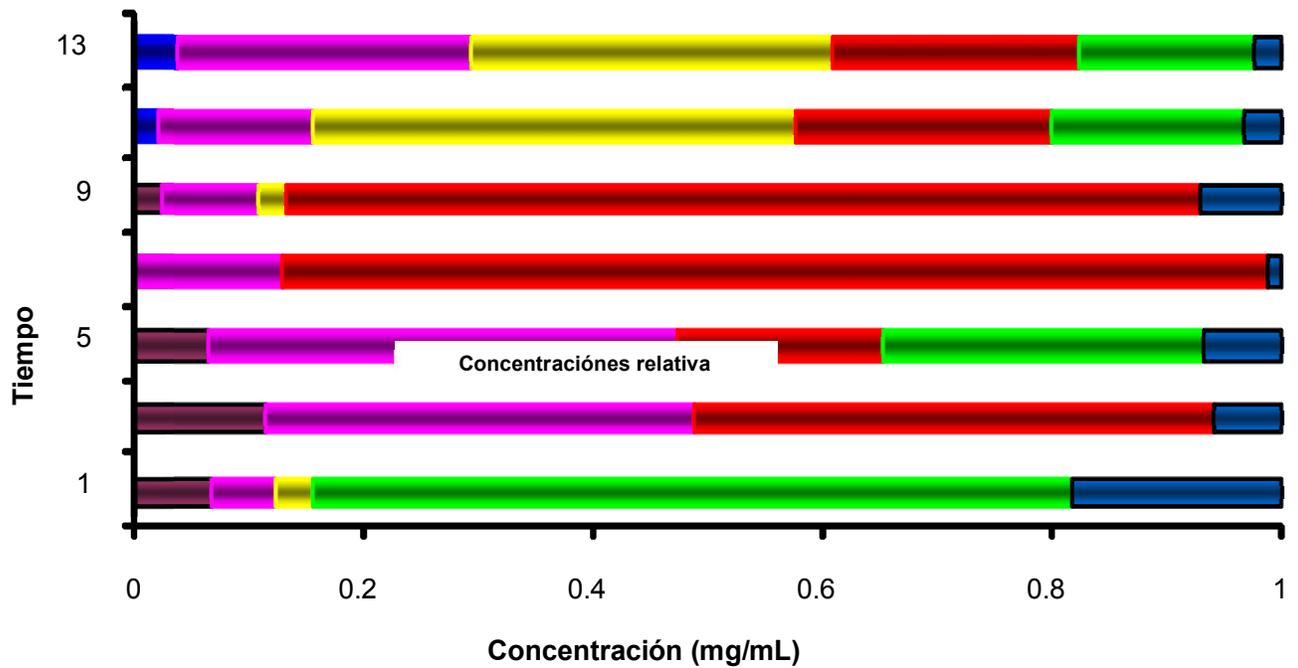


Fig. 7. Concentración relativa de péptidos de 2 a 5 kDa, presentes en la leche fermentada comercial durante 13 días en refrigeración a 4°C. Pesos moleculares expresados en kDa

Muchos de los péptidos de bajo peso molecular, menores a 2 kDa (Fig. 8), permanecieron hasta el final del almacenamiento refrigerado, después de su aparición (1.2, 1.4, 1.7 kDa); los demás aparecieron y disminuyeron su concentración, o definitivamente no se volvieron a encontrar.

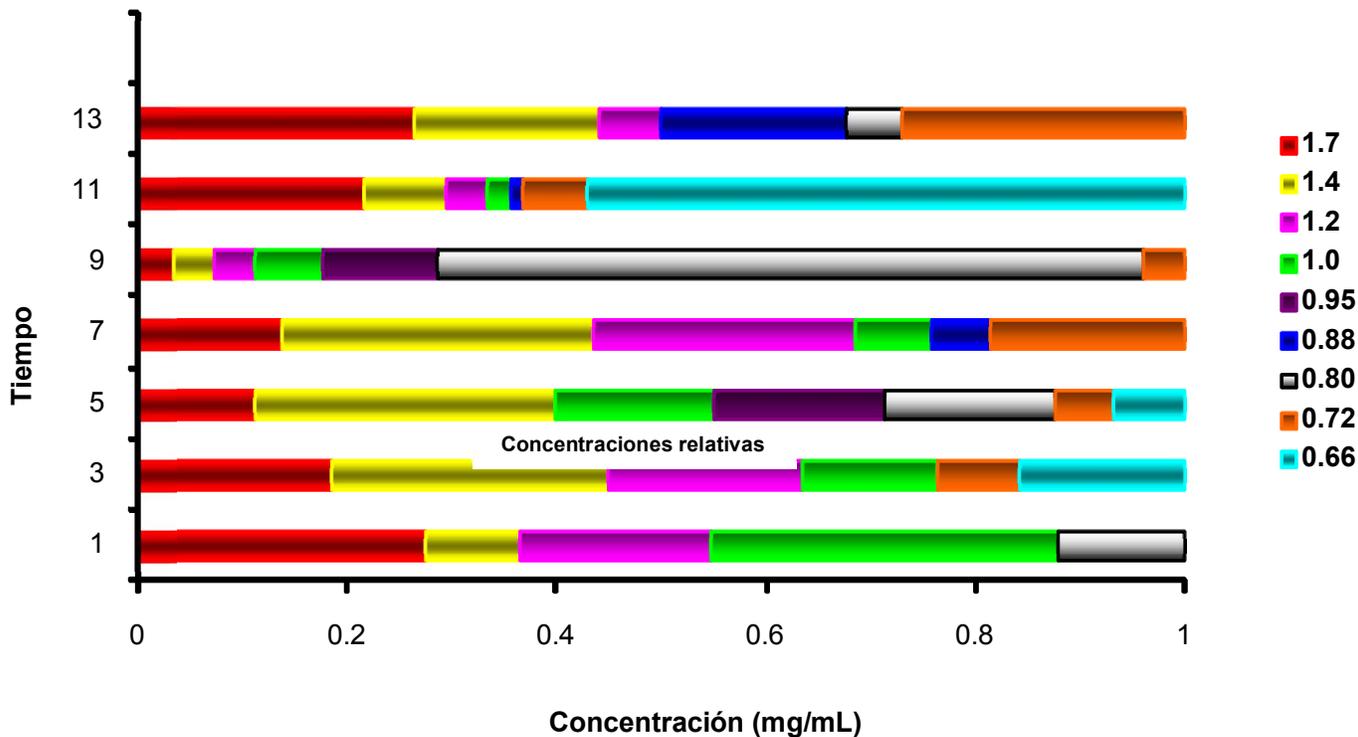


Fig. 8. Concentración relativa de péptidos menores a 2 kDa, presentes en la leche fermentada comercial durante 13 días en refrigeración a 4°C. Pesos moleculares expresados en kDa

Con este análisis podemos decir que la formación de péptidos de bajo peso molecular y con importancia biológica, se da de forma escalonada como lo proponen Gasson y de Vos, (1994), es decir, se parte de una proteína para dar lugar por hidrólisis a un péptido de peso mayor, posteriormente a un péptido de peso intermedio, y así finalizar con un péptido de bajo peso molecular.

5.5. Separación e identificación de péptidos por HPLC.

5.5.1. Separación de péptidos.

El perfil de péptidos separados por columna de exclusión de la leche fermentada por *S. thermophilus* y *L. acidophilus*, se puede observar en la Fig. 9. La mayoría de los péptidos fueron encontrados durante todos los días de la toma de muestras durante el almacenamiento refrigerado, con un incremento en la concentración de péptidos hasta el final del estudio. El tiempo de retención de

cada péptido en la columna permitió calcular el peso molecular, debido al principio de exclusión. A partir del minuto 39 se observan los primeros péptidos separados, con pesos moleculares menores a un kilodalton. Muchos autores han reportado péptidos con actividad biológica de diferentes pesos moleculares que van desde 7000 daltons hasta los 230 daltons (Rokka y col., 1997; Meisel y Fitzgerald 2000; Hartmann y Meisel, 2007)

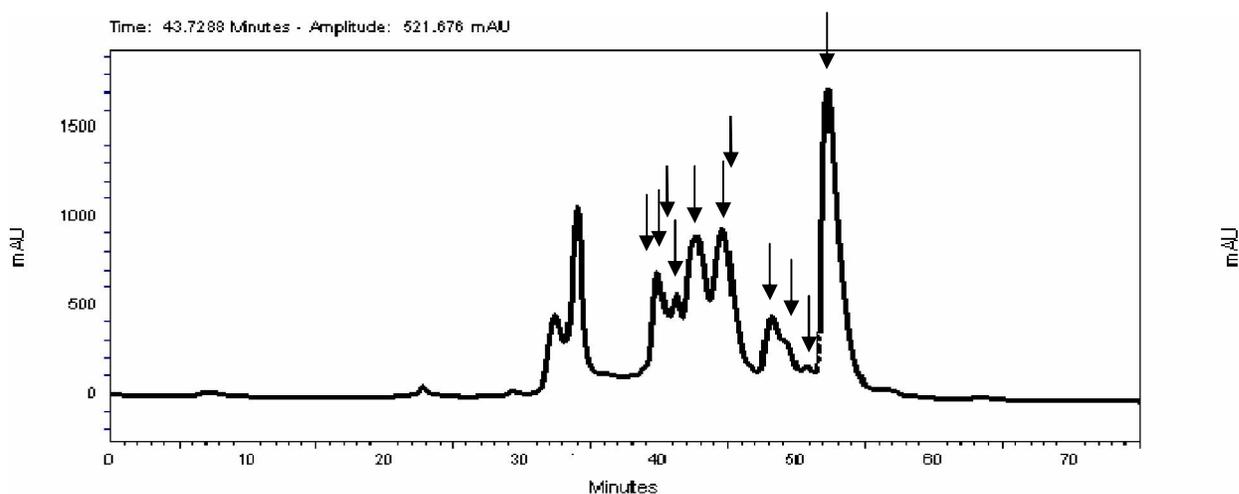


Fig. 9. Cromatograma del sobrenadante de muestra del día 7, columna Biosep-Sec2000 tasa de flujo de 0.25 mL/m, 20°C, gradiente isocrático, buffer de fosfatos 0.1M pH 6.8. (Flechas de izquierda a derecha peso en kDa 7.86, 6.21, 5.62, 4.55, 3.86, 3.10, 2.68, 1.61, 1.43, 1.14, 0.87)

Después de verificar la presencia de péptidos menores a 14.4 kDa en la electroforesis, se realizó la separación e identificación de fracciones peptídicas por medio de HPLC en columna de exclusión molecular (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración de péptidos ($\mu\text{g}/\text{mL}$) durante el almacenamiento en frío determinados por HPLC.

Número de péptido	Peso molecular kDa	Concentración $\mu\text{g}/\text{ml}$						
		Día 1	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 11	Día 13
1	7.86	1.078 \pm 0.19						2.04 \pm 0.05
2	6.21		20.88 \pm 0.11	24.31 \pm 0.02		21.19 \pm 0.03	22.47 \pm 0.32	30.45 \pm 2.32
3	5.62	19.67 \pm 0.03						
4	4.55	8.61 \pm 0.37	7.095 \pm 0.02	8.57 \pm 0.19	22.71 \pm 0.53	21.18 \pm 0.30	7.35 \pm 0.05	10.94 \pm 0.67
5	3.86	34.37 \pm 1.37	33.17 \pm 7.00	34.84 \pm 0.15	10.31 \pm 0.18		37.78 \pm 0.33	54.11 \pm 3.22
6	3.10				39.84 \pm 0.44	44.15 \pm 0.48	49.53 \pm 0.45	
7	2.68		39.40 \pm 0.00	41.75 \pm 0.63	40.21 \pm 0.74	53.32 \pm 6.18		59.55 \pm 0.98
8	1.61		10.96 \pm 0.154	11.84 \pm 0.65	0.73 \pm 0.10	2.95 \pm 0.35	20.42 \pm 0.31	18.96 \pm 0.44
9	1.43	38.79 \pm 1.32	4.30 \pm 0.21	4.63 \pm 0.29	22.97 \pm 0.44	20.55 \pm 0.07		8.93 \pm 1.13
10	1.14	8.35 \pm 0.41	1.17 \pm 0.05	1.89 \pm 0.30	1.98 \pm 0.13	3.98 \pm 0.21	1.16 \pm 0.043	2.99 \pm 0.06
11	0.87	70.40 \pm 3.08	55.19 \pm 2.62	61.60 \pm 1.75	67.96 \pm 0.92	46.27 \pm 3.26	68.84 \pm 0.68	101.84 \pm 6.54
TOTAL		181.26 \pm 16.03	172.17 \pm 14.11	180.96 \pm 8.37	206.71 \pm 9.08	213.59 \pm 1.97	207.55 \pm 6.93	289.81 \pm 20.98

En el primer día de monitoreo se identificaron 7 péptidos menores a 14.4 kDa y se observó que la concentración de péptidos permaneció constante ($P \geq 0.05$) (Fig.10) hasta el día 5 a pesar de que si aumentó el número de péptidos (6.21 y 2.68 y 1.61 kDa). De acuerdo al análisis estadístico ($P \geq 0.05$) en el día 7 (Fig. 10) se encontró un ascenso en la concentración de péptidos, después de este aumento, la concentración de péptidos permanece constante durante los días 9 y 11, para tener un nuevo aumento en el día 13, alcanzando el máximo de concentración en este punto ($P \geq 0.05$).

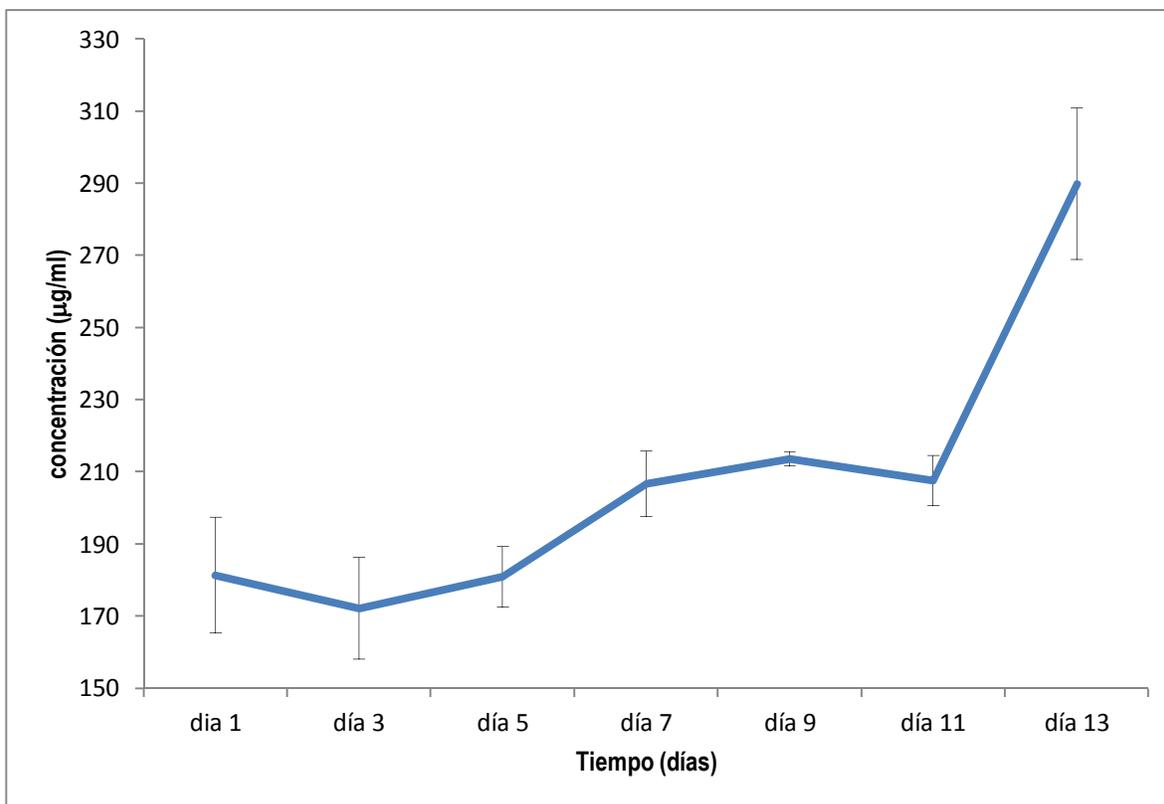


Fig. 10 Grafica de evolución de la concentración de péptidos en una cinética de refrigeración durante 13 días. Analizada por HPLC

Hubo péptidos que se encontraron durante toda la cinética de refrigeración (4.55, 3.86, 1.61, 1.43, 1.14 y 0.87 kDa) mientras que hubo otros como los de 3.10 y 2.68 kDa, que solo aparecieron en el día 5 y desaparecieron en el 9, sin embargo el péptido de 2.68 kDa volvió a aparecer en el día 13, en una concentración de 59.55 µg/mL, esta concentración es la más alta al final de la cinética, después de la del péptido de menor peso molecular (0.87 kDa) que fue de 101.84 µg/mL (Tabla 4).

Si tomamos en cuenta que la viabilidad de las bacterias se pudo conservar aún en refrigeración (Nighswonger y col., 1996; Donkor y col., 2007c), puede ser determinante en la aparición de péptidos. Otros autores como Vinderola y col. (2002) observaron que en almacenamiento a 4°C, la producción de péptidos fue mayor en un cultivo con algunas cepas de *S. thermophilus* y *L. acidophilus* comparado con otros probióticos en fermentación simbiótica o sola.

Los péptidos que se encontraron, menores a 2 kDa pueden estar relacionados con péptidos bioactivos, debido solamente a su peso molecular, ya que diversos autores han reportado péptidos de menos de 2 kDa biológicamente activos (Rokka y col., 1997; Meisel, 1998; Meisel, 2001; Clare y Swaisgood, 2000). Durante el almacenamiento refrigerado, se ha observado que hay acumulación de péptidos por la actividad proteolítica de los microorganismos en leches fermentadas (Nighswonger y col., 1996, Donkor y col., 2007c; Nielsen y col. 2009). En el presente trabajo se encontró que, la tendencia de formación y acumulación de péptidos es similar a la tendencia observada en los análisis de Lowry y de electroforesis. Sin embargo los resultados de la concentración obtenida a partir del análisis por HPLC se consideran con mayor exactitud debido a la mayor fiabilidad del análisis. En la Fig. 11 podemos observar una comparación de la tendencia de formación de péptidos durante el almacenamiento refrigerado en los dos análisis, electroforesis y HPLC por exclusión molecular.

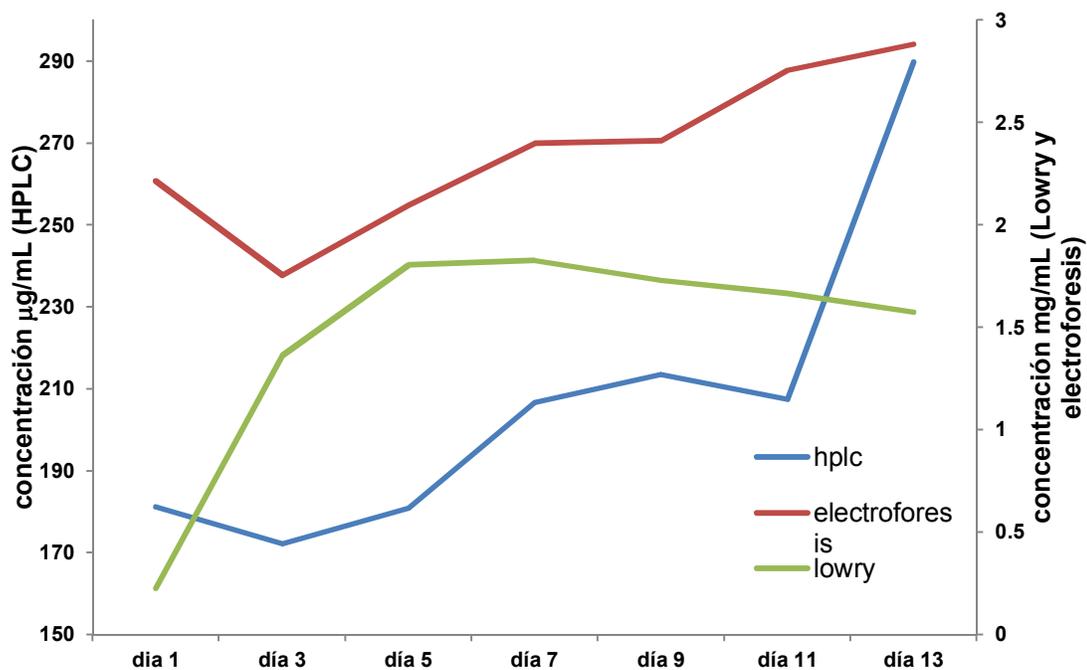


Fig. 11. Comparación de la evolución de la concentración de péptidos del almacenamiento refrigerado a 4°C durante 13 días, en análisis por HPLC (exclusión de tamaño), por electroforesis (Tricina-SDS-PAGE) y por método de Lowry

- Una de las características que pueden afectar el resultado en el análisis de péptidos solubles por el método de Lowry, tienen que ver con las interferencias propias del análisis. Se han reportado interferencias, por la interacción de los reactivos, con gomas; detergentes como SDS y principalmente con carbohidratos, en este caso con residuos de lactosa (Kirazov y col., 1993). Por otro lado, se ha determinado que el método de electroforesis se puede utilizar como análisis cuantitativo, tomando en consideración las interacciones de los reactivos y del método. Se ha observado que la presencia de gomas y de carbohidratos, provocan errores en la resolución, debido a imágenes barridas en el gel de separación, al mismo tiempo la entrada de agua a los poros del gel de poliacrilamida hace que estos presenten un diámetro mayor, provocando migraciones más veloces y no uniformes (García-Pérez, 2000). El método de electroforesis utilizado para la separación de péptidos, es un método cualitativo muy exacto para péptidos de 1 a 10 kDa, para péptidos fuera de este rango, el método se vuelve inexacto y la resolución es baja después de la tinción, provocando que se dificulte el cálculo de concentración de bandas separadas, resultado en problemas de resolución. (Schägger y Von Jagow, 1987). Los resultados obtenidos por el análisis de HPLC, fueron más cercanos a los reportados por distintos autores (Meisel, 2004; Donkor y col., 2007b y c)

5.5.2. Identificación de péptidos.

En la tabla 5 observamos la comparación de los péptidos encontrados en el análisis por electroforesis y los encontrados por HPLC.

Tabla 5. Comparación de péptidos encontrados con péptidos reportados. (Clare y Swaisgood, 2000; Gonzalez-Olivares, 2004; Meisel, 2004)

Péptidos Electroforesis (kDa)	Péptidos HPLC (kDa)	Péptidos Bibliografía P.M. (kDa)	Función *	Proteína de origen
3.10	3.09	3.11	IM, ATM	Lactoferrina
2.50	2.68	2.70	AM, ACE-I, ATM, IM.	BCN, As1CN(1,3,4)
1.70	1.61	1.62	ACE-I, AM, AM, ACE-I	As1CN (1,2) BCN (3,4)
1.40	1.42	1.39	ACE-I, AM	As1CN (1,2)
1.20	1.14	1.18, 1.15	AM, ACE-I	As1CN, BCN
0.88	0.871	0.885	ACE-I, opioide	BCN, BCN

* AM: Acarreador de minerales; IM: Inmunomodulatorio; ATM: Antitrombótico; AC-I: Antihipertensivo.

Se realizó una comparación de los pesos moleculares de los péptidos encontrados en los análisis de HPLC y electroforesis, encontrado algunas coincidencias, entre ellos y en péptidos reportados en la bibliografía como bioactivos. Algunos péptidos de pesos moleculares mayores a 4 kDa, que fueron identificados a lo largo del almacenamiento frío, no encontraron coincidencia alguna con péptidos reportados, lo cual no quiere decir que su potencial bioactivo este descartado, más aún es importante destacar que algunos autores (Rokka y col., 1997; Meisel, 2001; Clare y Swaisgood 2000;), han reportado péptidos con poder antihipertensivo y opioide, de peso molecular superior a 4 kDa. Se puede observar que algunos peso moleculares de los péptidos encontrados, coinciden con más de un péptidos reportado, proveniente de diferente fuente, es decir péptidos originados de diferentes proteínas de la leche. Esto lleva a la conclusión, que más de una técnica es necesaria para determinar no el peso molecular sino las características de este, con lo cual se acotaría de manera sustancial las características de dicho péptido. Al tener estas coincidencias en los pesos moleculares y al tener más de una oportunidad de reconocimiento (similitud en peso molecular con más de un péptido), se eleva la expectativa de encontrar más de un péptido, con diferente función pero con peso molecular igual.

De acuerdo a los cálculos de concentración realizados, del análisis de HPLC, podemos observar características similares en el comportamiento de la concentración respecto al análisis de electroforesis, es decir, observamos que hay aparición y desaparición de péptidos principalmente en lo referente a los péptidos de más de 4.5 kDa. En la Fig. 12 podemos observar que el péptido de 7.86 kDa aparece en el día 1 y desaparece, para volver a presentarse hasta el final del almacenamiento refrigerado; de igual forma observamos que el péptido de 5.62 kDa aparece en el día 3 y no se vuelve a presentar en ningún día del almacenamiento. En el caso del péptido de 6.21 kDa, experimenta un ascenso en los niveles de concentración, alcanzando un máximo y desapareciendo en los días subsecuentes, para el péptido de 4.55 kDa se observó aumento y disminución durante el estudio; este péptido se observó durante todo el almacenamiento refrigerado. Este comportamiento, como ya se discutió con anterioridad en la sección correspondiente al análisis de resultados de electroforesis, se puede deber a que son la fuente de formación de péptidos de peso molecular menor.

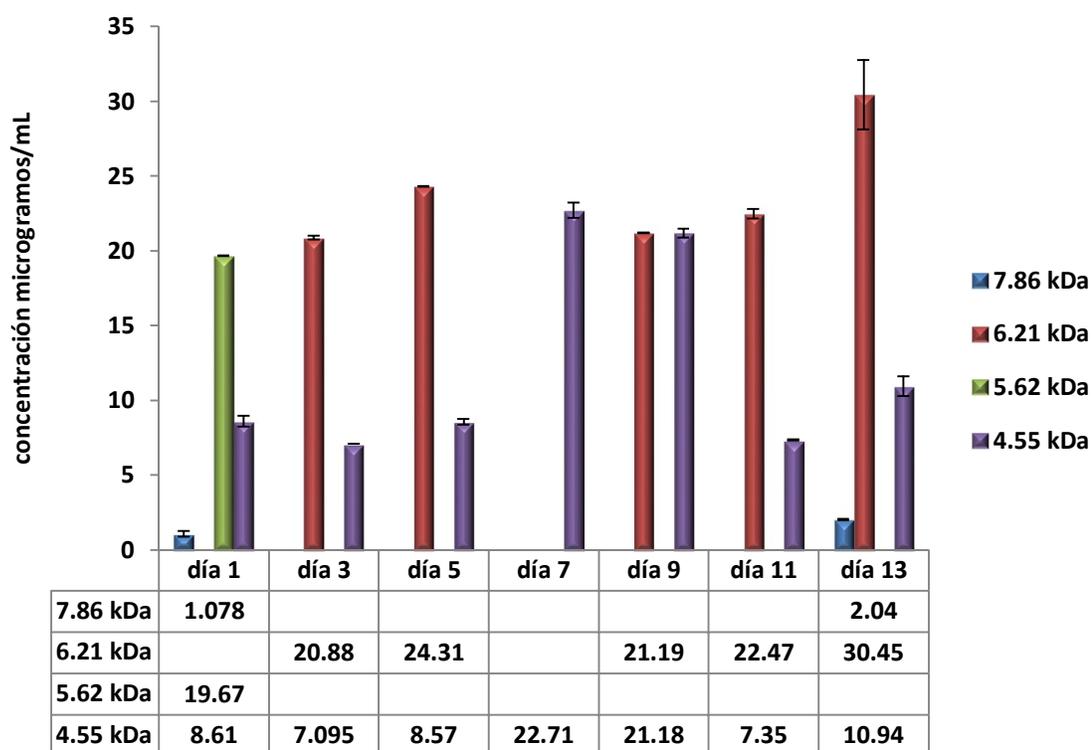


Fig. 12. Concentración de péptidos analizados por HPLC durante el almacenamiento en refrigeración de peso molecular mayores a 4.5 kDa.

En la Fig. 13, se muestra el mismo comportamiento que en los péptidos entre 2 y 4.5 kDa. Se puede observar aparición y desaparición para los péptidos de 3.86 y de 3.10 kDa, mientras que después de su aparición en el día 3, el péptido de 2.68 kDa, se acumuló hasta el último día del almacenamiento.

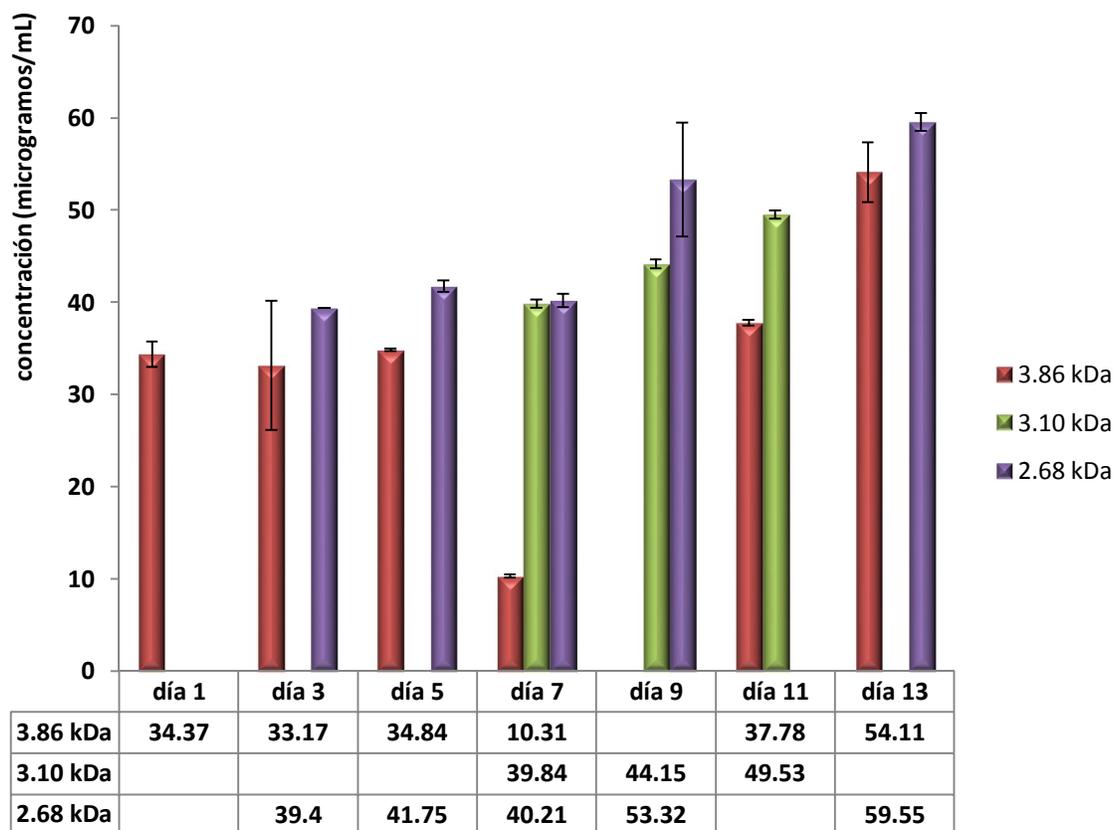


Fig. 13. Concentración de péptidos analizados por HPLC durante el almacenamiento en refrigeración entre 2 y 4.5 kDa.

Finalmente, en la Fig.14 se muestra el comportamiento de la concentración de los péptidos de peso molecular menor a 2 kDa. Se presentó acumulación de los péptidos de 1.61 y el de 0.87 kDa, además que se observaron durante todo el almacenamiento a partir de su aparición. En el caso de los péptidos de 1.43 y de 1.14 kDa, se observaron durante todo el almacenamiento a partir de su aparición, sin embargo no hubo acumulación en la concentración de ellos y las concentraciones finales fueron menores a 10 $\mu\text{g/mL}$.

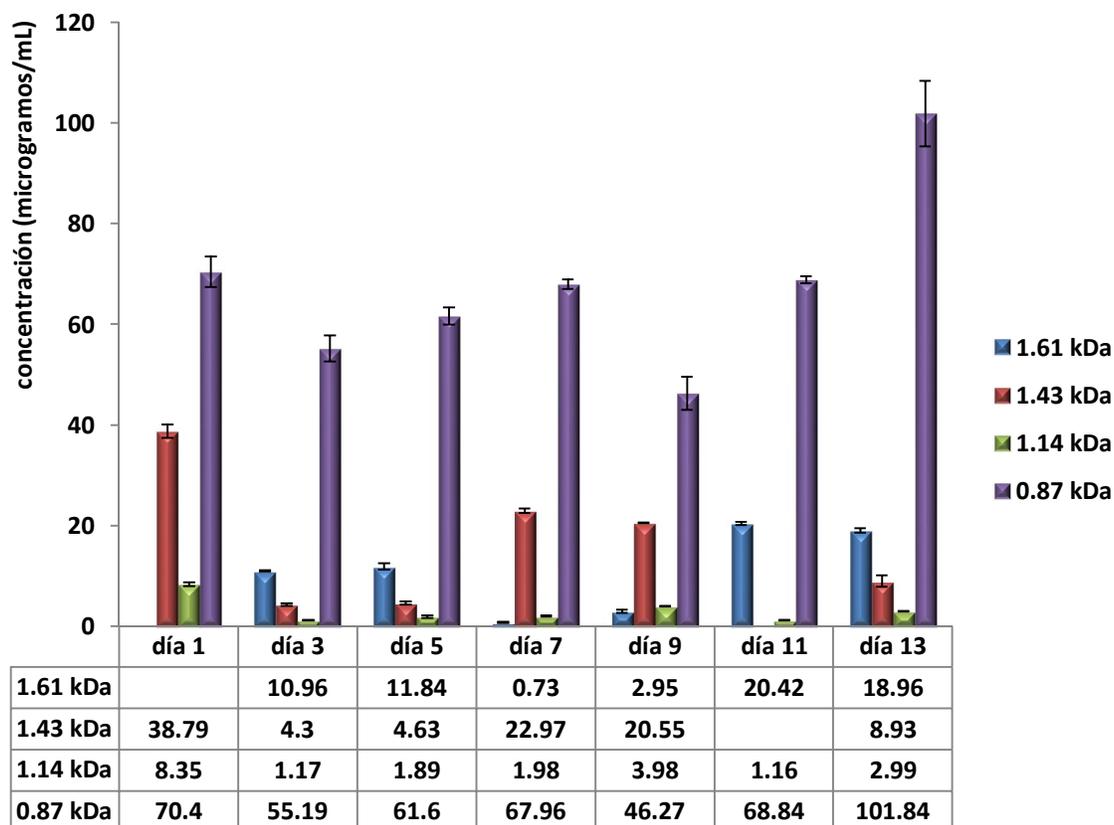


Fig. 14. Concentración de péptidos analizados por HPLC durante el almacenamiento en refrigeración menores a 2 kDa.

Un análisis posterior de los datos que se presenta en la Fig.15, muestra como al hacer un agrupamiento por peso molecular, de las concentraciones de los péptidos (mayores a 4.5 kDa, entre 2 y 4.5 kDa y menor a 2 kDa) la concentración de péptidos del primer grupo tiene un comportamiento variable, con una concentración constante hasta el día 7 y con aumentos y disminuciones de concentración hasta el final del almacenamiento en refrigeración, mientras las concentraciones del primer grupo disminuyen, las del segundo aumentan en los días 3, 7, 9 y 13. Aunado a este comportamiento se encuentra un claro aumento de la concentración de los péptidos del tercer grupo, de los péptidos de bajo peso molecular, en donde se observa una mayor concentración al final del almacenamiento.

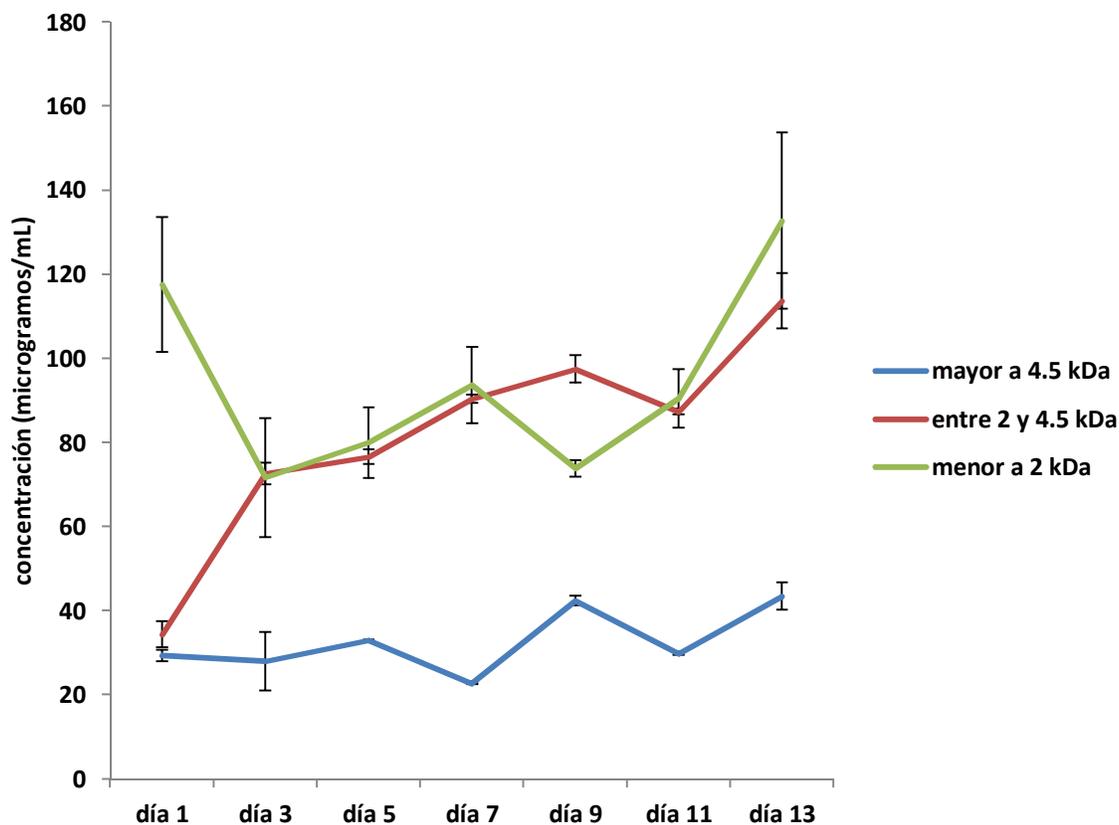


Fig. 15. Comparación del comportamiento de la concentración de péptidos en el almacenamiento en refrigeración, agrupados por pesos moleculares.

Esto nos lleva a confirmar que el sistema de formación de péptidos sigue patron en cascada, donde el sustrato para la formación de los péptidos de peso molecular alto, son las proteínas, el sustrato de los péptidos de peso molecular intermedio son los péptidos de peso molecular alto y finalmente estos son el sustrato de los péptidos de bajo peso molecular, aunado a ello esta por supuesto el sistema proteolítico de bacterias lácticas, el cual trabaja de esta forma (Gasson y de Vos, 1994). Se ha reportado que el sistema proteolítico de bacterias lácticas está íntimamente ligado a la acumulación de péptidos de diferentes tamaños y tipos, dependiendo de las necesidades nutricionales de cada BAL, en el presente trabajo las diferencias funcionales del aparato proteolítico entre *L. acidophilus* y *S. thermophilus*, fue el principal responsable de encontrar esta diversidad de moléculas en las fracciones peptídicas (Poolman 1995). Aún cuando la temperatura óptima de las proteinasa y peptidasas de BAL se encuentra entre 25 y

37°C (Juille y col., 2005) la actividad continúa aún en refrigeración, tanto en el rompimiento de proteínas como de péptidos (Nighswonger y col., 1996; Nielsen y col., 2009).

Se realizó una comparación de la detección de péptidos a diferentes longitudes de onda (Fig. 16) a 257, 280 y 210nm; las dos primeras son las longitudes de onda donde los aminoácidos aromáticos tienen su máxima absorción de luz, a 257nm fenilalanina y 280nm para tirosina y triptofano (Creighton 1990).

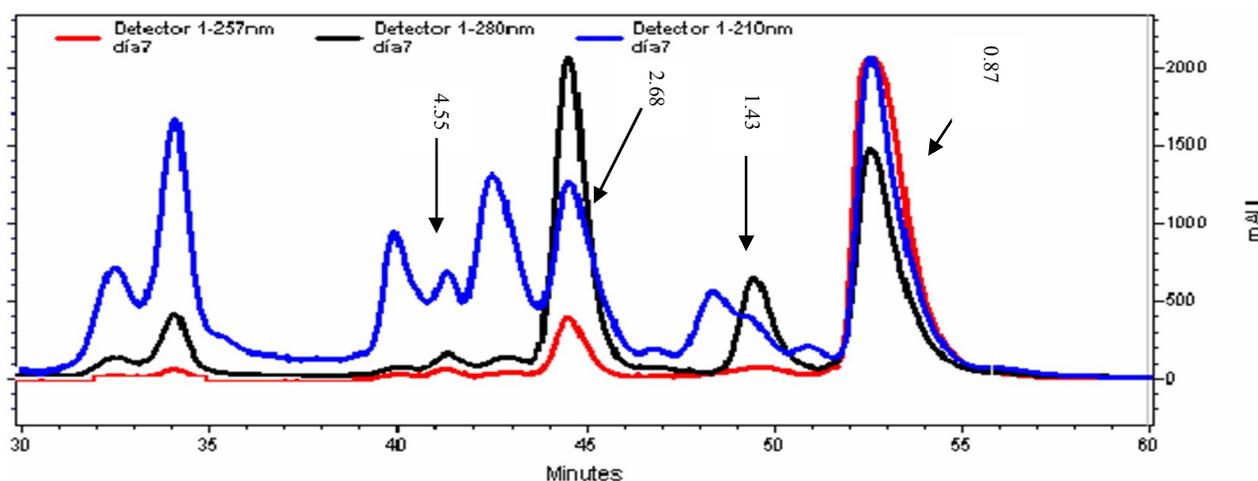


Fig. 16. Comparación de cromatogramas obtenidos del análisis de péptidos en la muestra del día 7 por HPLC de exclusión molecular a diferentes longitudes de onda, 210, 257 y 280nm. Las flechas indican la posición del péptido con su correspondiente peso molecular en kDa.

Se puede observar que solo algunos péptidos se detectaron en estas dos longitudes de onda. Se ha reportado que los péptidos opioides y los péptidos antihipertensivos, tienen en sus estructuras aminoácidos aromáticos (Rokka y col., 1997; Wu y col., 2006; Saito, 2008) y que los microorganismos presentes en la leche fermentada comercial analizada son productores de este tipo de péptidos (Takano, 2002). Al comprobar la presencia de aminoácidos aromáticos en

diferentes fracciones peptídicas de la muestra analizada, se aumenta la posibilidad de encontrar péptidos con estas características.

Al analizar la relación entre la absorción de luz a 280 y 257 entre 210nm, se observó que, hubo más péptidos con absorción en el rango de 257 que de 280, lo cual quiere decir que las estructuras de los péptidos liberados tienen concentraciones de fenilalanina mayor que de tirosina y triptofano. De igual forma observamos que, los péptidos que mostraron absorción a 280nm (2.9, 1.3 y 0.87kDa), son péptidos de pesos moleculares menores a 3kDa (Fig. 17), más aun estos péptidos también absorbieron luz en el rango de 257nm además de que fueron los péptidos que más intensidad de señal de absorción de luz mostraron, lo cual nos puede referirse a que entre menor peso molecular, los aminoácidos aromáticos están más expuestos en la estructura del péptido, ya que solo encontramos estructura primaria en ellos mientras que en péptidos mayores podemos encontrar algunos plegamientos de la estructura. Se ha descrito la influencia de la especificidad de las enzimas microbianas sobre la concentración y la diversidad de los péptidos liberados a partir de las caseínas durante el proceso de fermentación (Marshall y Tamime, 1997). Además, se ha descrito que el carácter hidrofóbico de los péptidos favorece de manera notable su actividad inhibitoria de la ACE (Saito, 2008). Por otro lado se ha observado (Miyoshi y col., 1991; Matsumura y col., 1993; Fujita y col., 2000; Wu y col., 2006) la importancia de la presencia de aminoácidos aromáticos, principalmente Phe, junto con prolina en péptidos con alta actividad inhibitoria de la ACE, en el extremo C-terminal. Debido a los requerimientos nutricionales de las BAL, se tiene una acumulación de péptidos de cadena corta (2 a 6 aminoácidos) (Dave y Shah, 1998; Gomes y col., 1998). Aunque los requerimientos nutricionales del estreptococo son diferentes (Letrot y col., 2002) y tienen un sistema muy avanzado a manera de operación de producción de aminoácidos (leucina, isoleucina y valina) (Garault y col., 2000) también genera péptidos de bajo peso molecular en leches fermentadas, además de que su nula necesidad de péptidos aromáticos permite la acumulación de estos en el medio de fermentación (Akpemado y Bracquart, 1983; Letrot y Julliard,

2001), a diferencia del lactobacilo, el cual tiene necesidades de fenilalanina y triptófano (Morishita y col., 1981). Mientras que los lactobacilos pueden transportar al interior de la célula péptidos de hasta 9 aminoácidos (Garault y col., 2001), en los estreptococos el sistema de transporte de oligopéptidos tiene afinidad por péptidos de hasta 23 aminoácidos, además de poseer tres enzimas ligadoras en el sistema de transporte de oligopéptidos (amiA1, amiA2 y amiA3) en lugar de una como en las demás bacterias lácticas (OppA) (Garault y col., 2001; Fernández-Espla y Rul, 1999). La importancia de este sistema tiene que ver con la existencia de dos dipeptidasas en el interior de la célula del estreptococo, que son específicas para arginina y prolina; estas enzimas no se han encontrado en ninguna otra bacteria láctica, lo que la hace más eficiente en el corte al interior de la célula debido a las limitaciones encontradas en las proteinasas de la membrana celular, lo cual permite, después del corte de oligopéptidos en el interior de la célula, la expulsión de péptidos de dos y tres aminoácidos (Rul y Monnet, 1997; Fernandez-Espla y Rul, 1999). De igual manera la acumulación constante de péptidos con actividad biológica antihipertensiva, se puede deber a una peptidasa intracelular específica para aminoácidos aromáticos, que realiza liberaciones constantes de fenilalanina (Fernandez-Espla y Rul, 1999) además de los péptidos acumulados conteniendo arginina y glutamina, productos de la acción de dos aminopeptidasas intracelulares específicas para péptidos con N-terminal del estreptococo (Ramchandran y Shah, 2008).

5.5.3. Relación de péptidos encontrados con péptidos conocidos.

Se realizó una comparación de péptidos reportados en la bibliografía con características antihipertensivas y con aminoácidos aromáticos en su estructura, con los péptidos de pesos moleculares similares a los encontrados en este estudio (Tabla 6). Con esta comparación y con el análisis de la composición aminoacídica de los aminoácidos aromáticos de las fracciones separadas por HPLC, se aumenta la probabilidad de encontrar péptidos antihipertensivos en leches fermentadas con *S. thermophilus* y *L. acidophilus*.

Tabla 6. Relación de péptidos encontrados con péptidos reportados

Peso molecular péptido encontrado (kDa)	Peso molecular péptido reportado (kDa)	Posible Origen	Posible Función	Referencia
2.68	2.6	β -CN f(128-149)	Antihipertensivo	Robert, y col. 2004
1.43	1.4	β -CN f(94-106)	Antihipertensivo	Quirós y col. 2005
0.87	0.87 0.86	α_{s1} -CN f(157-164) β -CN f(98-105)	Antihipertensivo	Contreras y col. 2009 Hernández-Ledezma y col. 2004

6. CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados y a los resultados obtenidos podemos concluir lo siguiente:

- Al determinar el nitrógeno soluble por medio de la técnica de Lowry, se pudo realizar una estandarización de las muestras en los diferentes análisis (electroforesis y HPLC) lo cual permitió que la formación de péptidos siguiera un patrón con el fin de poder comparar los resultados arrojados en cada uno de los análisis. Se obtuvo una formación constante de péptidos, hasta llegar a un máximo y posteriormente se mantuvo esta formación hasta el final del almacenamiento refrigerado a 4°C.
- De acuerdo a la especificidad del sistema proteolítico de bacterias lácticas, se sabe que se produce la captación de péptidos de hasta 23 aminoácidos, lo que permite la posterior acumulación de péptidos de menor peso molecular, con un contenido de aminoácidos aromáticos, debido a que las necesidades nutricionales del estreptococo lo permiten.
- La acumulación de péptidos de bajo peso molecular, sigue un patrón de cascada debido a la acción de proteinasas y peptidasas del sistema proteolítico de bacterias lácticas, donde a partir del corte de proteínas, se generan péptidos de alto peso molecular, que sirven de sustrato para la formación de péptidos de peso intermedio para que a su vez estos últimos sean el sustrato para la formación de los péptidos de bajo peso molecular.
- La presencia de aminoácidos aromáticos en las fracciones péptidicas obtenidas, aumentan la probabilidad de encontrar péptidos con actividad antihipertensiva, de acuerdo a los resultados obtenidos por otros autores, que han comprobado la importancia de la presencia de aminoácidos aromáticos junto con prolina en péptidos con actividad antihipertensiva.

- Se observó la formación de péptidos menores de 1 kDa (0.87 kDa) de gran interés ya que se ha reportado que muchos de los péptidos con mayor actividad antihipertensiva, son de peso molecular menor a 1 kDa. Además, se encontraron péptidos de pesos moleculares variables (4.55, 2.68 y 1.43 kDa) con presencia de aminoácidos aromáticos que son necesarios en las secuencias de péptidos antihipertensivos
- De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que la técnica de electroforesis solo puede ser empleada para el cálculo de pesos moleculares ya que las concentraciones obtenidas exceden a lo reportado por diferentes autores, es por ello que la técnica de HPLC es un método más confiable ya que las concentraciones obtenidas se aproximan a los valores bibliográficos (Meisel, 2004; Donkor y col., 2007b y c)
- Para tener una mejor visualización de los péptidos en la técnica de electroforesis Tricina SDS-PAGE, fue necesario hacer modificaciones de la técnica de Schägger y Von Jagow, (1987) en tiempo de corrida, condiciones de corrida (temperatura de 4°C) y en la tinción, haciendo más visibles los péptidos al teñir con Sypro Orange.
- Las adecuaciones a la técnica de HPLC por exclusión molecular, se realizaron comparando solo con técnicas para proteínas y péptidos de peso molecular superior a 5 kDa. Las condiciones presentadas en este trabajo fueron las más adecuadas para la separación de péptidos

7. BIBLIOGRAFIA

- Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. e Itoh, T. (1998). Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *Journal of Dairy Science*, 81, 3131-3138.
- Adhikari, K.; Mustapha, A.; Grün, I.U. y Fernando, L. (2000). Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, 83, 1946-1951.
- Akpemado, K.M. y Bracquart, P.A. (1983). Uptake of branched-chain amino acids by *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 45,136-140
- Anastasiou, R.; Papadelli, M.; Georgalaki, M.D.; Kalantzopoulos, G. y Tsakalidou, E. (2002). Cloning and sequencing of the gene encoding X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase (PepX) from *Streptococcus thermophilus* strain ACA-DC4. *Journal of Applied Microbiology*. 93, 52-59.
- Araujo, M.C.; Melo, R.L.; Cesari, M.H.; Juliano L. y Carmona, A.K. (2000). Peptidase specificity Characterization of C- and N- terminal catalytic sites of angiotensin-I-converting enzyme. *Biochemistry*, 39: 8519-8525.
- Baudin, B. (2002). New aspects on angiotensin-converting enzyme from gene to disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 40, 256-265.
- Bello, M.; Pérez-Hernández, G.; Fernández-Velasco, D.A.; Arreguín-Espinosa, R. y García-Hernández, E. Energetics of protein homodimerization: Effects of water sequestering on the formation of β -lactoglobulin dimer (2008). *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 70, 1475-1487.
- Berkhout, B.; Floris, R.; Recio, I. y Visser, S. (2004). The antiviral activity of milk protein lactoferrin against the human immunodeficiency virus type 1. *Biomaterials*, 17, 291-294.
- Binevski, P.V.; Sizova, E.A.; Pozdnev, V.F. y Kost. O.A. (2003). Evidence for the negative cooperativity of the two active sites within bovine somatic angiotensin-converting enzyme. *FEBS Letters*, 550, 84-88.

- Bosman, B.W.; Tan, P.S.T. y Konings W.N. (1990) Purification and characterization in a tripeptidase from *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* Wg2. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1839-1843.
- Boutron, M. C.; Faivre, J.; Marteau, P. ; Couillault, C. ; Senesse, P. y Quipourt, V. (1996). Calcio, phosphorus, vitamin D, dairy products and colorectal carcinogenesis : a french case-controlled study. *British Journal of Cancer*, 74,145-151.
- Briand, L., Chobert, J. M. y Haertle, T. (1994). Tryptic hydrolysis of sterilized β -casein and β -lactoglobulin. *Milchwissenschaft*, 49, 367-371.
- Brody, E.P. (2000). Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition*, 84, 539-546.
- Caligant, A., Dumay, E., Casas Valencia, C., Cuq, J. L. y Cheftel, J. C. (1991). Surface hydrophobicity and aggregation of β -lactoglobulin heated near neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 2147.
- Cervato, G., Cazzola, R. y Cestaro, B. (1999). Studies on the antioxidant activity of milk caseins. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 50, 291-296.
- Chabance, B., Jolles, P., Izquierdo, C., Mazoyer, E., Francoual, C., Drouet, L. y Fiat, A. M. (1995). Characterization of an antithrombotic peptide from β -casein in newborn plasma after milk ingestion. *British Journal of Nutrition*, 73, 582-590.
- Chabance, B., Marteau, P., Rambaud, J. C., Migliore-Samour, D., Boynard, M., Perrotin, P., Guillet, R., Jolles, P. y Fiat, A. M. (1998). Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk and yogurt. *Biochimie* 80, 155-165.
- Chan, D.I.; Prenner, E.J. y Vogel, H.J. (2006). Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *BBA Biomembranes*, 1758: 1184-1202.
- Chang, K. J., Lillian, A., Hazum, E. y Cuatrecasas, P. (1981). Morphicetin: a potent and specific agonist for morphine (μ) receptors. *Science*, 212, 75-77.
- Chapot-Chartier, M.P.; Rul, F.; Nardi, M. y Gripon, J.C.. (1994). Gene cloning and characterization of PepC, a cysteine aminopeptidase from *Streptococcus*

- thermophilus*, with sequence similarity to the eukaryotic bleomycin hydrolase. *European Journal Of Biochemistry*, 224, 497-506.
- Chavagnat, F.; Casey, M.G. y Meyer, J. (1999). Purification, characterization, gene cloning, sequencing, and overexpression of aminopeptidase N from *Streptococcus thermophilus* A. *Applied Environmental Microbiology*, 65, 3001-3007.
- Cheung, H. S., Wang, F. L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F. y Cushman, D. W. (1980). Binding of peptides substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Journal of Biology and Chemistry*, 25, 401-407.
- Chopin, A. (1993). Organization and regulation of genes for amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review*, 12, 21-38
- Christensen, J.E.; Lin, D.; Palva, A. y Steele, J.L. (1995). Sequence analysis, distribution and expression of an aminopeptidase N-encoding gene from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Gene*. 155, 89-93
- Clare, D. A. y Swaisgood, H.E. (2000). Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83, 1187-1195.
- Clare, D.A., Catignani, G.L. y Swaisgood, H.E. (2003). Biodefense properties of milk: The role of antimicrobial proteins and peptides. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1239-1255.
- Contreras, M., Carrón, R., Montero, M.J., Ramos, M. y Recio, I. (2009). Novel-casein derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, 19, 566-573
- Cook, J. J., Huang, T. F., Rucinsky, B., Tuma, R. F., Williams, J. A. y Niewiarowski, S. (1988). Inhibition of platelet hemostatic plug formation by trigramin, a novel RGD peptide. *Circulation*, 78, 1248.
- Corring, T., Levenez, F., Cuber, J. C., Beaufre, B., Bories, A., Maubois, J. L., Leonil, J. y Fauquant, J. (1997). Release of CCK in humans after the ingestion of GMP. Abstract, *International Whey Conference, American Dairy Products Institute/ International Dairy Federation*, Rosemount, Illinois, USA, Oct. 27-29.
- Courtin, P.; Monnet, V. y Rul, F. (2002). Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus* / *Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology* 148, 3413-3421.

- Creamer, L. K. y MacGibbon, A. K. H. (1996). Some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids. *International Dairy Journal*, 6, 539-568.
- Creighton, T.E. (1990) Protein folding. *Biochemistry Journal*, 270,1-16.
- Dave, R.I. y Shah, N.P. (1998). Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *Journal of Dairy Science*, 81,2804-2816
- De-Noni, I. (2008). Release of β -casamorphin 5 y 7 during simulated gastro-intestinal digestión of bovine β -casein variants and milk-based infant formulas. *Food Chemistry*, 110, 897-903.
- De Simone,C.; Vesely, R.; Bianchi, S. y Jirillo, E. (1993). The role of probiotics in the modulation of the immune system in man and in animals. *International Journal of Immunotherapy*, 9,23-28.
- Deutsch, S.M.; Molle, D.; Gagnaire, V.; Piot, M.; Atlan, D. y Lortal, S. (2000). Hydrolysis of sequenced β -casein peptides provides new insight into peptidase activity from thermophilic lactic acid bacteria and highlights intrinsic resistance of phosphopeptides. *Applied Environmental Microbiology*. 12, 5360-5367.
- Diplock, A. T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. B. y Roberfroid, M. B. (1998). Scientific concepts of functional foods in Europe, consensus document. Bruselas: *ILSI Europa*, p. 17.
- Donkor, O.N.; Henriksson, A.; Valjevic, T. y Shah, N.P. (2007 a). Effect of acidification on the activity of probiotics in yogurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 16, 1181-1189.
- Donkor, O.N.; Henriksson, A.; Valjevic, T. y Shah, N.P. (2007 b). Survival and activity of selected probiotic organisms in set type yogurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 17, 657-665.
- Donkor, O.N.; Henriksson, A.; Valjevic, T. y Shah, N.P. (2007 c). ACE-inhibitory activity of probiotic yogurt. *International Dairy Journal*, 16, 1321-1331.
- Döring, F., Will, J., Amasheh, S., Clauss, W., Ahlbrecht, H. y Daniel, H. (1998). Minimal molecular determinants of substrates for recognition by the intestinal peptide transporter. *Journal of Biology and Chemistry*, 273, 23211-23218.

- Drouet, L., Bal dit Sollier, C., Cissie, M., Pignaud, G., Mazoyer, E., Fiat, A. M., Jolles, P. y Caen, J. P. (1990). The antithrombotic effect of KRDS, a lactotransferrin peptide, compared with RGDS. *Nouvelle Revue Francaise Hematologie*, 32, 59-62.
- Exterkate, F.A.; Altling, A.C. y Bruinenberg, P.G. (1993). Diversity of cell envelope proteinase specificity among strain of *Lactococcus lactis* and its relationship to charge characteristics of the substrate-binding region. *Applied Environmental Microbiology* 59, 3640-3647.
- Fazel, A. (1998). Nutritional and health benefits of yogurt and fermented milks. Functional peptides. *Danone World Newsletter*.
- Fernandez-Espla, M. D.; Garault, P.; Monnet, V. y Rul, F. (2000). *Streptococcus thermophilus* cell anchored proteinase: release, purification and biochemical and genetic characterization. *Applied Environmental Microbiology*. 66, 4772-4778.
- Fernández-Espla, M.D. y Rul, F. (1999). PepS from *Streptococcus thermophilus* a new member of the aminopeptidase family of thermophilic bacteria. *European Journal of Biochemistry*. 263,502-510
- Ferrairo, C.M.; Jessup, J.; Chappell, M.C.; Averill, D.B.; Brosnham, K.B.; Tallant, A.; Diz, D.I. y Gallagher, D.E. (2005). Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin-II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzymes. *Circulation*, 111, 2605-2610.
- Fiat, A. M., Migliore-Samour, D., Jolles, P., Drouet, L., Bal dit Sollier, C. y Caen, J. (1993). Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *Journal of Dairy Science*, 76, 301-310.
- Figueroa-González, I., Hernández-Sánchez, H., Rodríguez-Serrano G., Gómez-Ruiz L., García-Garibay M., Cruz-Guerrero A. (2010) Antimicrobial effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota co-cultivated with *Escherichia coli* UAM0403. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 9, 11-16.
- Fitzgerald, R.J. y Meisel, H. (2000). Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *British Journal of Nutrition*, 84, 33-37.
- Fitzgerald, R.J.; Murray, B.A. y Walsh, D.J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *Journal of Nutrition*, 134, 980S-988S.

- Fosset, S. y Tomé, D. (2001). Biological activities of milk peptides. *Cahiers Agricultures*, 10:299-305.
- Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H. (2003). En: *Advanced Dairy Chemistry*, Vol. 1: Proteins. Springer, 3ra. edición
- Fuglsang, A.; Nilssen, D. y Nyborg, N.C.B. (2002). Cardiovascular effects of fermented milk containing angiotensin-converting enzyme inhibitors evaluated in permanently catheterized, spontaneously hypertensive rats. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3566-3569.
- Fujita, H., Yokoyama, K. y Yoshikawa, M. (2000). Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *Journal of Food Science*, 65, 564-569.
- Garault, P., Letrot, C., Juillard, V. y Monnet, V. (2000). Branched-chain amino acid biosynthesis essential for optimal growth of *Streptococcus thermophilus* in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5128-5133
- Garault, P., Letrot, C., Juillard, V. y Monnet, V. (2001). La biosynthèse des acides aminés à chaîne branchée et des purines: deux voies essentielles pour une croissance optimale de *Streptococcus thermophilus* dans le lait. *Lait*. 81, 83-90.
- García-Garibay, J.M.; Quintero –Ramírez y López-Munguía, (1993) Cap. 9: alimentos y bebidas fermentadas tradicionales. En: *Biología Alimentaria*, Ed. LIMUSA, México D.F.
- García-Pérez, H.M. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Univ. Diag.* 2000, 31-41.
- Gasson, M. J. y Vos, W. M. de., 1994, Cap.4 : The proteolytic system of lactic acid bacteria, *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, editor Gasson, M. J.; Vos, W. M. de., ed. *Blackie Academic y Professional an Imprint of Chapman y Hall*. 169-210
- Gilbert, Ch.; Blanc, B.; Frot-Coutaz, J.; Portalier, R. y Atlan, D. (1997). Comparison of cell surface proteinase activities within the *Lactobacillus* genus. *Journal of Dairy Research*, 64:561-571.

- Gill, I., Lopez-Fandino, R., Jorba, X. y Vulfson, E. N. (1996). Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 162-183.
- Gobbetti, M.; Ferranti, P.; Smacchi, E.; Goffredi, F. y Addeo, F. (2000). Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 551 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3898-3904.
- Gobbetti, M.; Minervini, F. y Rizzello, C.G. (2006). En: *Handbook of Food Products Manufacturing*. Cap 70: Bioactive peptides in dairy products. Y.H. Hur Senior Scientist.
- Gobbetti, M.; Minervini, F. y Rizzello, C.G. (2004). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 173-188.
- Godovac-Zimmermann, J. y Brautnizer, G. (1987). Modern aspects of the primary structure and function of β -lactoglobulins. *Milchwissenschaft*, 42, 294.
- Gomes, A.M.P., Malcata F.X. y Klaver, F.A.M. (1998). Growth enhancement of *Bifidobacterium lactis* B0 and *Lactobacillus acidophilus* ki by milk hydrolyzates. *Journal of Dairy Science*, 81,2817-2825
- González-Olivares, L.G. (2004). Liberación de péptidos bioactivos por bacterias lácticas. Universidad Autónoma metropolitana. Tesis de Grado de Maestría.
- Gorbach, S.L. (2000). Probiotics and gastrointestinal health. *The American Journal of Gastroenterology*, 95, S2-S4.
- Guo, Y.; Pan, D. y Tanokura, M. (2008). Optimization of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, 114, 328-333.
- Hanna, N.; Ahmed, K.; Anwar, M.; Petrova, A.; Hiatt, M. y Hegyi, T. (2004). Effect of storage on breast milk antioxidant activity. *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal*, 89: F518-F520.
- Haque, E. y Chand, R. (2008). Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. *European Food Research and Technology*. 227, 7-15.

- Hartmann, R. y Meisel, H. (2007). Food-derived with biological activity: from research to food application. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 163-169.
- Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y. 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.
- Hayashi, M.A.F. y Camargo, A.C.M. (2005). The bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. *Toxicon*, 45, 1163-1170.
- Hernández-Ledezma, B., Amigo, L., Ramos, M. y Recio, I. (2004). Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52,1504-1510
- Hernández-Ledezma, B.; ramos, M.; Recio, I. y Amigo, I. (2006). Effect of β -lactoglobulin hydrolysis with thermolysin under denaturing temperaturas on the release of bioactive peptides. *Journal of Chromatography*, 1116, 31-37.
- Hiraoka, Y., Segawa, T., Kuwagina, K., Sugai, S. y Murai, N. (1980). α -lactalbumin: a calcium metalloprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95, 1098-1104.
- Holman, R.R.; Paul, S.; bethel, M.A.; Neil, H.A.W. y Matthews, D.R. (2008). Long-term follow-up after tight control of blood pressure in type 2 diabetes. *New England Journal of Medicin*, 359, 1565-1575.
- Hols, P.; Hancy, F.; Fontaine, L.; Grossiord, B.; Prozzi, D.; Leblond_Bourget, N.; Decaris, B.; Bolotin, A.; Delorme, C.L.; Ehrlich, S.D.; Monnet, V.; Guedon, E.; Renault, P.; y Kleerebezem, M. (2005). New insights in the molecular biology and Physiology of *Streptococcus thermophilus* reveled by comparative genomics. *FEMS Microbiology Review*, 29, 435-463
- Jezova, D., Tokarev, L., Kostalova, L. y Strbak, V. (1996). Presence of atriopeptin-like immunoreactivity in human and rat milk. *General Physiology and Biophysics*, 15, 333-338.
- Jollès, P., Levy-Toledano, S., Fiat, A. M., Soria, C., Gillensen, D., Thomaidis, A., Dunn, F. W. y Caen, J. P. (1986). Analogy between fibrinogen and casein. Effect of

- an undecapeptide isolated from β -casein on platelet function. *European Journal of Biochemistry*, 158, 379-382.
- Juillard, V., Laan, H., Kunji, E. R. S., Jeronimus-Stratingh, C. M., Bruins, A. P. y Konings, W. N. (1995). The extracellular PI-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes β - casein into more than one hundred different oligopeptides. *Journal of Bacteriology*, 177, 3472-3478.
- Juille, O., Le Bars, D y Juillard, V, (2005). The specificity of oligopeptide transport by *Streptococcus thermophilus* resembles that of *Lactococcus lactis* and not that of pathogenic streptococi. *Microbiology*. 151,1987-1994
- Kang, J. H., Lee, M. K., Kim, K. L. y Hahm, K. S. (1996). Structure-biological activity relationship of 11-residue highly basic peptide segment of bovine lactoferrin. *International Journal of Peptide Research*, 48, 357-363.
- Karaki, H., Doi, K., Sugano, S., Uchiwa, H., Sugai, R. y Murakami, U. (1990). Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 96C, 367-371.
- Kayser, H. y Meisel, H. (1996). Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptide derived from bovine milk proteins. *FEBS Letters*. 383, 18-20.
- Kim, S. K., Byun, H. G., Park, P. J. y Shahidi, F. (2001). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2992-2997.
- Kirazov, L. P., Venkov, L. G. and Kirazov, E. P. (1993) Comparison of the Lowry and the Bradford protein assays as applied for protein estimation of membrane-containing fractions. *Analytical Biochemistry*. 208, 44–48.
- Kitts, D.D. (2005). Antioxidant properties of casein-phosphopeptides. *Trends in Food Science and Technology*., 16:549-554.
- Klein, J.R.; Klein, U. Schad, M. y Plapp, R. (1993). Cloning DNA sequence analysis and partial characterization of *pepN* a lysis aminopeptidase from *Lactobacillus delbrückii* subsp. *Lactis* DSM7290. *Eur. J. Biochem*. 217, 105-114
- Kohama, Y., Matsumoto, S., Oka, H., Terramoto, T., Okabe, M. y Mimura, T. (1988). Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 155, 332-337.

- Kohama, Y., Oka, H., Kayamori, Y., Tsujikawa, K., Mimura, T., Nagase, Y. y Satake, M. (1991). Potent synthetic analogues of angiotensin-converting enzyme inhibitor derived from tuna muscle. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 2169-2170.
- Korhonen, H. (2009) Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods* 1, 177-187
- Korhonen, H. y Pihlanto-Lepälä, A. (2003). Food-derived bioactive peptides: Opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1297-1308.
- Korhonen, H. y Pihlanto-Lepälä, A. (2006) Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*. 16, 945-960.
- Korhonen, H., Pihlanto-Lepälä, A., Rantamaki, P. y Tupasela, T. (1998). Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 307-319.
- Kost, N.V.; Sokolov, O.Y.; Kurasova, O.B.; Dimitrev, A.D.; Tarakanova, J.N., Gabaeva, M.V.; Zolotarev, Y.A.; Dadoyan, A.K.; Grachev, S.A.; Korneeva, E.V.; Mikheeva, I.G. y Zozulya, A.A. (2009). β -casamorphin 7 in infants on different type of feeding and different levels of psychomotor development. *Peptides*, 30, 1854-1860.
- Kunji, E. R. S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B. y Konings, W. N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 187-221.
- Kunji, E. R. S.; hagting, A.; De Vries, C.J.; Juillard, V.; Haandrikman, A.J.; Poolman, B. y Konings, W.N. (1995). Transport of β -casein-derived peptides by the oligopeptide transport system is a crucial step in the proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *Journal of Biology and Chemistry*, 270, 1569-1574.
- Kuwabara, Y., Nagai, S., Yoshimitsu, N., Nakagawa, I., Watanabe, Y. y Tamai, Y. (1995). Antihypertensive effect of the milk fermented by culturing with various lactic acid bacteria and a yeast. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80, 294-295.
- Laan, H. y Konings, W. N. (1989). The mechanism of proteinase release from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 3103-3106

- Lahov, E. y Regelson, W. (1996). Antibacterial and stimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Journal of Food Chemical Toxicology*, 34, 131-145.
- Lamarque, M.; Charbonnel, P.; Aubel, D.; Piard, J.Ch.; Atlan, D. y Juillard, V. (2004). A multifunction ABC transporter (Opt) contributes to diversity of peptide uptake specificity within the genus *Lactococcus*. *Journal of Bacteriology*, 186, 6492-6500.
- Lanzer, D.; Konno, K.; Marques-Porto, R.; Vieira-Portaro, F.C.; Stocklin, R.; Martins-de-Camargo, A.C. y Pimenta, D.C. (2004). Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. *Peptides*, 25, 1085-1092.
- Law, A. J. R., Leaver, J., Banks, J. M. y Horne, D. S. (1993). Quantitative fractionation of whey proteins by gel permeation FPLC. *Milchwissenschaft*, 48, 663-666.
- Law, A. J. R. y Leaver, J. (2000). Effect of pH on the thermal denaturation of whey proteins in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 672-679.
- Law, J. y Haandrikman, A. (1997). Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 7, 1-11.
- Leclerc, P.L.; Gauthier, S.F.; Bachelard, H.; Santure, M. y Roy, D. (2002). Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal*, 12, 995-1004.
- Leitgeb, B. y Tóth, G. (2005). Aromatic-aromatic and proline-aromatic interactions in endorphin-1 and endorphin-2. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 40, 674-686.
- Lemmonier, D. y Solís-Pereira, B. (1991) induction of 2'5'-a synthetase activity and interferon by bacteria used in dairy foods. *European Cytokine Network*, 2,137-140
- Leporanta, K. (2001). Developing fermented milks into functional foods. *Innovations in Food Technology*, 10, 46-47.
- Leroy, F. y DeVuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 67-78.

- Letrot, C. y Juillard, V. (2001). Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. *J. Appl. Microbiol.* 91:1023-1029.
- Letrot, C.; Nardi, M.; Garault, P.; Monnet, V. y Juillard, V. (2002). Casein utilization by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3162-3165.
- Loukas, S., Varaucha, D., Zioudrou, C., Streaty, R. A. y Klee, W. A. (1983). Opioid activities and structures of alpha-casein-derived exorphins. *Biochemistry*, 22, 4567-4573.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *Journal of Biological Chemistry*. 193,265-275
- Maeno, M.; Yamamoto, N. y Toshiaki, T. (1996). Identification of antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CD790. *Journal of Dairy Science*, 79, 1316-1321.
- Marshall, V. W. y Tamime, A. Y. (1997). Starter cultures employed in the manufacture of biofermented milks. *International Journal of Dairy Technology*, 50, 35-41.
- Maruyama, S., Miyoshi, S., Kaneko, T. y Tanaka, H. (1989). Angiotensin I- converting enzyme inhibitory activities of synthetic peptides related to the tandem repeated sequence of a maize endosperm protein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 1077-1081.
- Matar, C., Nadathur, S. S., Bakalinski, A. T. y Goulet, J. (1997). Antimutagenic effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* L89 and a protease-deficient derivative. *Journal of Dairy Science*, 80, 1965-1970.
- Matsufuji, H., Matsui, T., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M. y Osajima, Y. (1994). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolysate derived from sardine muscle. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 58, 2244-2245.
- Matsumura, N., Fujii, M., Takeda, Y., Sugita, K. y Shimizu, T. (1993). Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 57, 1743-1744.}

- Mazoyer, E., Lévy-Toledano, S., Rendu, F., Hermant, L., Lu, H., Fiat, A. M., Jollès, P. y Caen, J. (1990). KRDS, a new peptide derived from human lactotransferrin, inhibits platelet aggregation and release reaction. *European Journal of Biochemistry*, 194, 43-49.
- McCann, K.B.; Shiell, B.J.; Michalski, W.P.; Lee, A.; Wan, J.; Raginski, H. y Coventry, M.J. (2005). Insolation of Characterisation of antibacterial peptides derived from the f(164-207) región of bovine α_{s2} -casein. *International Dairy Journal*, 15, 133-143.
- Meisel, H. (1998). Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal*, 8, 363-373.
- Meisel, H. (2001). Bioactive peptides from milk proteins: a perspective for consumers and producers. *The Australian Journal of Dairy Technology*. 56,83-92.
- Meisel, H. (2004). Muntifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors*, 21, 55-61.
- Meisel, H. (2005). Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 1905-1919.
- Meisel, H. y Bockelmann, W. (1999). Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie van Leewenhoek.*, 76, 207-215.
- Meisel, H. y Fitzgerald, R.J. (2000). Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *British Journal of Nutrition*, 84, 27-31.
- Meisel, H. y Fitzgerald, R.J. (2003). Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1289-1295.
- Meisel, H., Frister, H. y Schlimme, E. (1989). Biologically active peptides in milk proteins. *Z. Ernährungswiss.*, 28, 267-278.
- Mierau, I. y Kunji, E. R. S., Venema, G. y Kok, J. (1997). Casein and peptide degradation in lactic acid bacteria. *Biotechnology and. Genetic Engineering Reviews*, 14, 279-301.
- Mihatsch, W.A.; Franz, A.R.; Kuhnt, B.; Högel, J. y Pohlandt, F. (2005). Hydrolysis of casein accelerates gstrointestinal transit via reduction of opioid receptor agonist released from casein in rats. *Biology of the Neonate*, 87, 160-163.

- Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H. y Maruyama, S. (1991). Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an alpha-zein hydrolysate. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 1313-1318.
- Monnet, V.; Ley, J.P. y González, S. (1992). Substrate specificity of the cell enveloped-located proteinase of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* NCDO763. *International Journal of Biochemistry*, 24, 707-718.
- Morishita, T., Deguchi, Y., Yajima, M., Sakurai, T. y Yura, T. (1981). Multiple nutritional requeriments of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *Journal of Bacteriology*, 148, 64-71
- Motoshima, H.; Shiraishi, T.; Tsukasaki, F. y Kaminogawa, S. (2003). Purification, characterization and gene clonning of lysil aminopeptidase from *Streptococcus thermophilus* YRC001. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 67, 772-782.
- Mullally, M. M., Meisel, H. y Fitzgerald, R. J. (1997a). Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Letters*, 402, 99-101.
- Mullally, M. M., Meisel, H. y Fitzgerald, R. J. (1997b). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *International Dairy Journal*, 7, 299-303.
- Murakami, L., Andree, J. P. y Berliner, L. J. (1982). Metal ion binding to α -lactalbumin species. *Biochemistry*, 21, 5488-5494.
- Murray, B.A.; y Fitzgerald, R.J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: Biochemistry, bioactivity and production. *Current Pharmaceutical Design*, 13, 773-791.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K. y Takano, T. (1995). Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Dairy Science*, 78, 1253-1257.
- Nielsen, M.S., Martinussen, T., Flambard, B., Sorensen, K. y Otte, J., (2009). Peptide profiles and angiotensin-i-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: effect of bacterial strain, fermentation, ph and storage time. *International Dairy Journal*, 19, 155-165.

- Nighswonger, B.D., Brashears, M. M. y Gilliland, S. E. (1996). Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*. 79,212-219.
- Niven, G.W.; Holder, S.A. y Stroman, P. (1995). A study of the substrate specificity of aminopeptidase N from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Appl. Microbiol. Biotechnology*, 44, 100-105.
- Nurminen, M. L., Sipola, M., Kaarto, H., Pihlanto-Leppala, A., Piilola, K., Korpela, R., Tossavainen, O., Coronen, H. y Vapaatalo, H. (2000). α -lactorphin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Science*, 66, 1535-1543.
- Okitsu, M., Morita, A., Kakitani, M., Okada, M. y Yokogoshi, H. (1995). Inhibition of the endothelin-converting enzyme by pepsin digests of food proteins. *Bioscience. Biotechnology Biochemistry*, 59, 325-326.
- Ortiz-Chao, P., Gómez-Ruiz, J.A., Rastall, R.A., Mills, P., Cramer, R., Pihlanto, A., Korhonen, H. y Jauregui, P. (2009). Production of novel ACE inhibitory peptides from β -lactoglobulin using protease N-amano. *International Dairy Journal*, 19,69-76.
- Osajima, K., Nakashima, M. y Osajima, Y. (1994). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolysate derived from sardine muscle. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*., 58, 2244-2245.
- Otte, J., Zakora, M., Qvist, K. B., Olsen, C. E. y Barkholt, V. (1997). Hydrolysis of bovine β -lactoglobulin by various proteases and identification of selected peptides. *International Dairy Journal*, 7, 835-848.
- Paterlini, M.G.; Avitabile, F.; Ostrowski, B.G.; Ferguson, D.M. y Portoghese, P.S. (2000). Stereochemical requirements for receptor recognition of the μ -opioid peptide endomorphin-1. *Biophysical Journal*. 78, 590-599.
- Pedrosa, MC.; Golner, BB.; Goldin, BR.; Barakat, S.; Dallal, G. y Russell, RM. (1995) survival of yogurt-containing organisms and *Lactobacillus gasserii* (ADH) and their effect on bacterial enzyme activity in gastrointestinal tract of healthy and hypochlorhydric elderly subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61,353-359.

- Perdigon, G., Alvarez, S. y Pesce de Ruiz Holgado, A. (1991). Oral immune adjuvant activity of *L. casei* influence of the dose administered on the secretory immune response. *Journal of Dairy Research*, 50, 485-496.
- Perez, M. D. y Calvo, M. (1995). Interaction of β -lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: a review. *Journal of Dairy Science*, 78, 978-988.
- Permyakov, E. A., Yarmolencko, V. V., Kalinichenko, L. P., Morozova, L. A. y Burnstein, E. A. (1981). Calcium binding to α -lactalbumin: structural rearrangements and association constant. *Biochemistry and Biophysical Research Communication*, 100, 191-197.
- Phelan, M., Aherne, A., Fitzgerald, R. y O'Brien, N. (2009) Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal* 19, 643-654.
- Phelan, M y Kennis, D. (2011). The potential role of milk-derived peptides in cardiovascular disease. *Food and Function*, 2, 153-167.
- Pihlanto-Lepälä, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16,1306-1314.
- Pihlanto-Lepälä, A. (2000). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins, opioid and ace inhibitory peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 347-356.
- Pihlanto-Leppälä, A.; Koskinen, P.; Pilola, K.; Tupasela, T. y Korhonen, H. (2000). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research*, 67, 53-64.
- Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T. y Korhonen, H. (1998). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from bovine milk proteins. *Int. Dairy J.*, 8, 325-331.
- Poolman, B., Kunji, E. R. S., Hagting, A., Juillard, V. y Konings, W. N. (1995). The proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *Society for Applied Bacteriology symposium series*, 2465S-2475S.

- Pritchard, G. G. y Coolbear, T. (1993). The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 179-203.
- Quirós, A., Hernández-Ledezma, B., Ramos, M., Amigo, L. y Recio, I. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *J. Dairy Sci.* 88,3480-3487
- Quirós, A.; Ramos, M., Muquerza, B.; Delgado, M.A.; Miguel, M.; Aleixandre, A. y Recio, I. (2006). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal*, 17, 33-41.
- Ramchandran, L. y Shah, N.P. (2008). Effect of versagel[®] on the growth and metabolic activities of selected lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*. 73:21-26.
- Renault, P. G.; Corthier, N.; Goupil, C.; Delorme, C. y Ehrlich, S.D. (1996). Plasmid vectors from Gram-positive bacteria switching from high low copy number. *Gene* 183, 175-182.
- Roberfroid, M.B. (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods?. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 6, 1682S-1687S
- Robert, M.C., Razaname, A., Mutter, M. y Juillerat, M.A. (2004). Identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6923-6931.
- Rokka, T. y Syvaöja, E. L., Tuominen, J. y Korhonen, H. (1997). Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of *Lactobacillus* GG fermented UHT milk. *Milchwissenschaft*, 52, 675-677.
- Rul, F. y Monnet, V. (1997). Presence of additional peptidases in *Streptococcus thermophilus* CNRZ 302 compared to *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology*, 82,695-704.
- Rul, F.; Monnet, V, y Gripon, J.C. (1994). Purification and characterization of a general aminopeptidase (St-PepN) from *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* CNRZ302. *Journal of Dairy Science*, 77,2880-2889.

- Rutherford-Markwick, J y Moughan, P.J. (2005). Bioactive peptides derived from food. *Journal of AOAC International*, 88, 955-966.
- Saito, T. (2008). Antihypertensive peptides derived from bovine casein and whey proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 606, 295-317.
- Saito, M. (2007). Role of FOSHU (food for specified health uses) for healthier life. *Yakugaku Zasshi*, 127, 407-416.
- Saito, T., Abubakar, A., Itoh, T., Arai, I. y Aimar, M. V. (1997). Development of a new type of fermented cheese whey beverage with inhibitory effects against angiotensin converting enzyme. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 48, 15-23.
- Saito, Y., Wanezaki, K., Kawato, A. e Imayasu, I. (1994). Antihypertensive effects of peptide in sake and its by-products on spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 812-816.
- Sato, H. y Feix, J.B. (2006). Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *BBA Biomembranes*, 1758, 1245-1256.
- Savijoki, K.; Ingmer, H. y Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 394-406.
- Schägger, H. y 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.
- Schlimme, E. y Meisel, H. (1995). Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. *Nahrung*, 39, 1-20.
- Smacchi, E. y Gobetti, M. (2000). Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology*, 17, 129-141.
- Schmidt, D. G. y Poll, J. K. (1991). Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. *Netherland Milk and Dairy Journal*, 45, 225-240.
- Schmieder, R.E.; Hilgers, K.F.; Schlaich, M.P. y Schmidt, B.M.W. (2007). Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *The Lancet*, 369, 1208-1219.

- Schmitt, C.; Bovag, C.; Vuilliomenet, A.M.; Rouvet, M.; Bovetto, L.; Barbar, R. y Sánchez, C. (2009). Multiscale characterization of individualized β -lactoglobulin microgels formed upon heat treatment under narrow pH range conditions. *Langmuir*, 25, 7899-7909.
- Severin, S. y WenShui, X. (2005). Milk biologically active components as nutraceuticals: Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45, 645-656.
- Shah, N.P.; Lankaputra, W.E.V.; Britz, M.L. y Kyle, W.S.A. (1995). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* in comercial yogurt during refrigerated storage. *International Dairy Journal*, 5: 515-521.
- Shah, N.P. (2000). Effects of milk-derived bioactive : an overview. *British Journal of Nutrition*, 84, 3-10.
- Shebuski, R. J., Berry, D. E., Romoff, R., Storer, B. L., Ali, F. y Samanen, J. (1989). Demonstration of Ac-Arg-Gly-Asp-Ser-NH₂ as an antiaggregatory agent in the dog by intracoronary administration. *Thrombosis and Haemostasis*, 61, 183-188.
- Shihata, A. y Shah, N. P. (2000). Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 10:401-408.
- Shin, H.S.; Lee, J.H.; Pestka, J.J. y Ustunol, Z. (2000). Viability of bifidobacteria in comercial dairy products during refrigerated storage. *Journal of Food Protection*, 63, 327-331.
- Sienkiewicz-Szlapka, E.; Jarmolowska, B.; Krawczuk, S.; Kostyra, E.; Kostyra, H. y Bielikowicz, K. (2009). Transport of bovine-milk-derived opioid peptides across Caco-2 monolayer. *International Dairy Journal*, 19, 252-257.
- Silva, S.V. y Malcata, F.X. (2005). Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*. 15, 1-15.
- Smacchi, E. y Gobbetti, M. (2000). Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology*, 17, 129-141.
- Stanton, C.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F. y Sinderen, D.V. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 198-203.

- Steijns, J. M. (2001). Milk ingredients as nutraceutical. *International Dairy Technology*, 54, 81-88.
- Steijns, J.M. y Hooijdonk, A.C.M. (2000). Occurrence structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *British Journal of Nutrition*, 84, 511-517.
- Storry, J. E., Grandison, A. S., Millard, D., Owen, A. J. y Ford, G. D. (1983). Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminants. *Journal of Dairy Research*, 50, 215.
- Suárez, F. L. y Savaiano, D.A. (1997). Diet, genetics, and lactose intolerance. *Food Technology*, 51,74-76.
- Swaigood, H. E. (1992). Chemistry of the caseins. En *Advanced Dairy Chemistry-1, Proteins*. Fox, P. F. (ed). *Elsevier Applied Science, London*, p. 63-110.
- Takano, T. (2002). Antihypertensive activity of fermented dairy products containing biogenic peptide. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 333-340.
- Takano, T. (1998). Milk derived peptides and hypertension reduction. *Int. Dairy J.*, 8, 375-381.
- Tan, P.S.T.; Alen-Boerrigtrb, I.T. y Poolman, B. (1992). Characterization of the *Lactococcus lactis papN* gene encoding an aminopeptidase homologus to mammalian aminopeptidase N. *FEBS*. 306, 9-16.
- Tan, P.S.T.; Sasaki, M.; bosman, B.W. e Isawaki, T. (1995). Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus helveticus* SBT2171. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3430-3435.
- Tirelli, A., De Noni, I. y Resmini, P. (1997). Bioactive peptides in milk products. *Italian Journal of Food Science*, 2, 91-98.
- Tomé, D., Dumontier, A. M., Hautefeuille, M. y Desjeux, J. F. (1987). Opiate activity and transepithelial passage of intact β -casomorphins in rat ileum. *American Journal of Physiology*, 253, G737-G744.
- Tong, L. M., Sasaki, S., McClements, D. J. y Decker, E. A. (2000). Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1473-1478.

- Tovar-Pérez, E.; Guerrero-Legarreta, I.; Farrés-González, A. y Soriano-Santos, J. (2009). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Food Chemistry*, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.02.062
- Trapp, C.L.; Chang, C.C.; Halpern G.M.; Keen, C.L. y Gershwin, M.E. (1993). The influence of chronic yogurt consumption on population of young and elderly adults. *International Journal of Immunotherapy*, 9,53-64.
- Treweek, T.M.; Thorn, D.C.; price, W.E. y Carver, J.A. (2011). The chaperon action of bovine milk α_{s1} - and α_{s2} - caseins and their associated from α_s -casein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071.
- Trompette, A., Claustre, J.; Caillon, F.; Jourdan, G.; Chayvialle, J.A. y Plaisancie, P. (2003). Milk Bioactive peptides and β -casamorphine induced mucus release in rat jejunum. *Journal of Nutrition*, 133, 3499-3503.
- Uhrínova, S.; Smith, M.H.; Jamerson, G.B.; Uhrín, D.; Sawyer, L. y Barlow, P.N. (2000). Structural Changes Accompanying pH-induced dissociation of the β -lactoglobulin dimer. *Biochemistry*, 39, 3565-3574.
- Urata, H., Boehm, K. D., Philip, A., Kinoshita, A., Gabrousek, J., Bumpus, F. M. y Husain, A. (1993). Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *Journal of Clinical Investigation*, 91, 1269-1281.
- VanderJagt, D. J., Okolo, S. N., Costanza, A., Blackwell, W. y Glew, R. H. (2001). Antioxidant content of the milk of Nigerian women and the sera of their exclusively breastfed infants. *Nutrition Research*, 21, 121-128.
- Vermeirssen, V.; Van-Camp, J. y Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92, 357-366.
- Vinderola, C.G., Mocchiutti, P. y Reinheimer, J. A. (2002). Interactions among lactic acid started and probiotic bacteria used for fermente dairy products. *Journal of Dairy Science*, 85,721-729.
- Vinderola, C.G.; Bailo, N. y Renheimer, J.A. (2000). Survival of probiotic microflora in argentinian yogurts during refrigerated storage. *Food Research International*, 33, 97-102.

- Whitney, R. McL. (1988). En *Proteins in milk*. Fundamentals of dairy chemistry. 3a edition. Van Nostrand Reinhold (ed). New York.
- Wijesinha-Bettoni, R.; Gao, Ch.; Jenkins, J.A.; Mackie, A.R.; Wilde, P.J.; Mills, C.E.N. y Smith, L.J. (2007). Heat treatment of bovine α -lactalbumin results in partially folded, disulfide bond shuffled states with enhanced surface activity. *Biochemistry*, 46, 9764-9784.
- Wong, D. W. S., Camirand, W. M. y Pavlath, A. E. (1996). Structures and functionalities of milk proteins. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, 36, 807-844.
- Wu, J. y Ding, X. (2001). Hipotensive and Physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 501-506.
- Wu, J.; Aluko, R.E. y Nakai, S. (2006). Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: quantitative structure-activity relationship study of di- and tri-peptides. *Journal of Agricultural and Fodd Chemistry*, 54, 732-738.
- Yalcin, A.S. (2006). Emerging therapeutic potential of whey proteins and peptides. *Current Pharmaceutical Design*, 12, 1637-1643.
- Yamamoto, N. y Takano, T. (1999). Antihypertensive peptides derived from milk proteins. *Nahrung*, 43, 159-164.
- Yamamoto, N., Akino, A. y Takano, T. (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 77, 917-922.
- Yamamoto, N.; Aquino, A. y Takano, T. (1993). Purification and specificity of a cell-wall-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Biochemistry*. 114, 740-745
- Yanagisawa, H.; Hammer, R.E.; Richardson, J.A.; Emoto, N.; Williams, S.C.; Takeda, S.; Clouthier, D.E. y Yanagisawa, M. (2000). Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting-enzyme -2 in murine cardiac development. *Journal of Clinical Investigation*, 105, 1373-1382.

- Yano, S., Suzuki, K. y Funatsu, G. (1996). Isolation from α -zein of thermolysin peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 661-663.
- Yasar, F.; Celik, S. y Köksel, H. (2006). The investigation of the secondary structures of various peptide sequences of β -casein by the multicanonical simulation method. *Physica*, 363, 348-358.
- Yoshikawa, M., Tani, F. y Chiba, H. (1988). Structure-activity relationship of opioid antagonist peptides derived from milk proteins. En *Peptide Chemistry*. Shiba, T. (ed) Osaka: protein research foundation. pp. 473-476.
- Zucht, H.D.; Forssmann, W.G. y Ständker, L. (2001). Purification of novel peptide antibiotics from human milk. *Journal of Chromatography*, 752, 369-377.
- Zucht, H.D., Raida, M., Andermann, K., Mägert, H.J. y Forsmann, W.G. (1995). Casocidin-I: a casein- α s₂-derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Lett.*, 372, 185-188.

APENDICE 1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

A. Preparación de soluciones para método de Lowry

REACTIVO A: Carbonato de sodio (Na_2CO_3) (Baker) al 2% en NaOH (Baker) 0.1N

REACTIVO B: Sulfato de Cobre (CuSO_4) (Baker) al 1%

REACTIVO C: Tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Baker) al 2%

REACTIVO D: Reactivo de Folin (Hycel) 1:1 con agua destilada (preparado al momento de utilizarse)

B. Preparación de soluciones para electroforesis para peptidos

B.1. Solución Stock de Acrilamida. (49.5% T, 6% C)

Porcentaje de acrilamida	46.5%
Porcentaje de bisacrilamida	3.0%

B.2. Composición del gel de separación. (16.5% T, 6% C)

Solución stock de acrilamida	3.22 mL
Buffer de separación pH 8.45	4.78 mL

El %T denota el porcentaje total de concentración de ambos monómeros (acrilamida y bisacrilamida), el %C denota el porcentaje de enlaces inter cruzados relativos. La solución se almacenó a 4°C.

B.3. Solución amortiguadora de separación

3.0 M de Tris.

0.3% de SDS

Ajustar el pH a 8.45 con HCl

B.4. Solución amortiguadora de la muestra

Agua desionizada	0.95mL
Buffer tris-HCl 0.5M ph 6.8	0.25mL
Glicerol	0.20mL
SDS 10%	0.40mL
Azul de bromofenol 1%	0.10mL

B.5. Solución amortiguadora de corrida (1X)

0.1M Tris base

0.1M tricina

0.1% SDS

C. Preparación de soluciones para electroforesis desnaturizante.

C.1. Solución de acrilamida/bis-acrilamida solución madre (T = 30%, C = 2.67%)

Se pesaron los siguientes reactivos y se disolvieron en 90 mL de agua desionizada

Acrilamida 29.2 g

Bis-acrilamida 0.8 g

Se aforó a 100 mL con agua desionizada.

C.2. Solución reguladora tris-hcl 1.5 M, pH 8.8

Tris (hidroximetil) amino metano 18.15 g. Se disolvió en 80 mL de agua desionizada y se ajustó el pH a 8.8 con HCl 6 N y por último se aforó a 100 mL con agua desionizada.

C.3. Solución reguladora tris-hcl 0.05 M, pH 6.8

Tris (hidroximetil) amino metano 6.0 g. Se disolvió en 60 mL de agua desionizada y se ajustó el pH a 6.8 con HCl 6 N y por último se aforó a 100 mL con agua desionizada.

C.4. Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%

Dodecil sulfato de sodio 0.1 g. Se aforó a 1 mL con agua desionizada y se guardó a 0 °C.

C.5. Solución de persulfato de amonio al 10%

Persulfato de amonio 0.1 g. Solución reguladora Tris-HCl pH 8.8 y 6.8 1 mL

Nota: Esta solución se preparó inmediatamente antes de usarse en un vial limpio.

C.6. Solución reguladora para la muestra

Agua desionizada 0.95 mL

Solución reguladora Tris-HCl 0.05 M pH 6.8 0.25 mL

Glicerol 0.20 mL

SDS 10% 0.40 mL

Azúl de bromofenol 1% 0.10 ML

C.7. Solución reguladora de corrida tris-glicina-sds pH 8.3 (5X)

Tris (hidroximetil) amino metano 4.5 g

Glicina 21.6 g

SDS 1.5 g

Se ajustó el pH a 8.3 con HCl y se aforó a 300 mL con agua desionizada. Se almacenó a 4 °C.

C.8. Solución desteñidora ácido acético (7%)-metanol (10%)

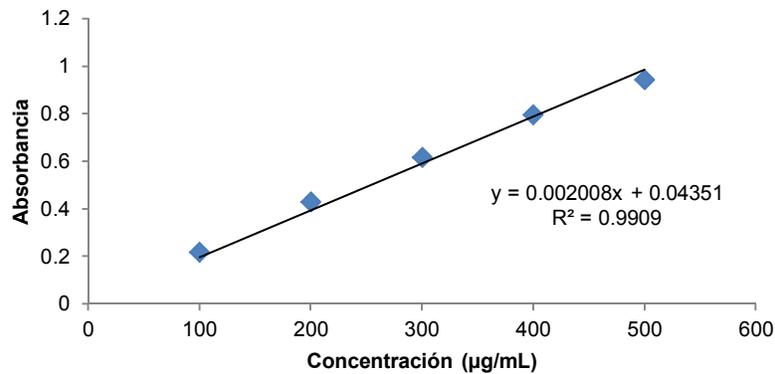
Metanol 20 mL

Ácido acético 14 mL

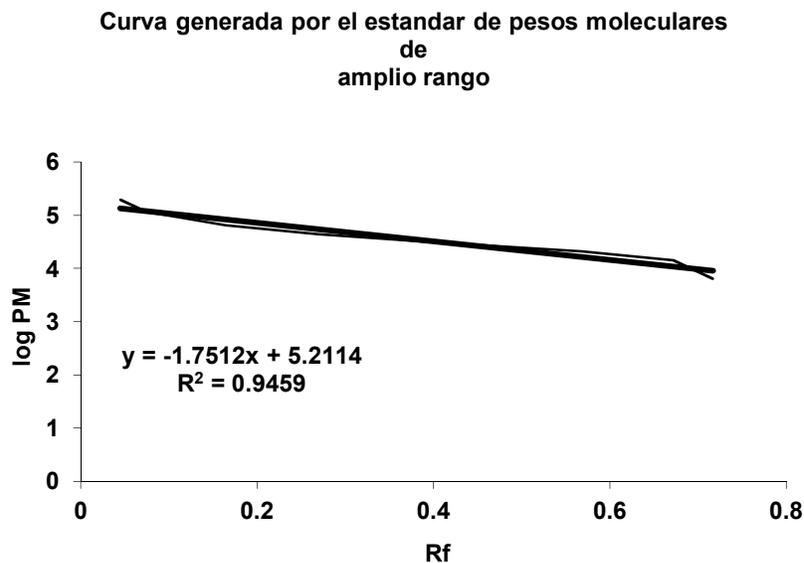
Se aforó la solución a 200 mL con agua desionizada. Se almacenó a 4 °C.

APENDICE 2. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE PATRONES DE PESO MOLECULAR.

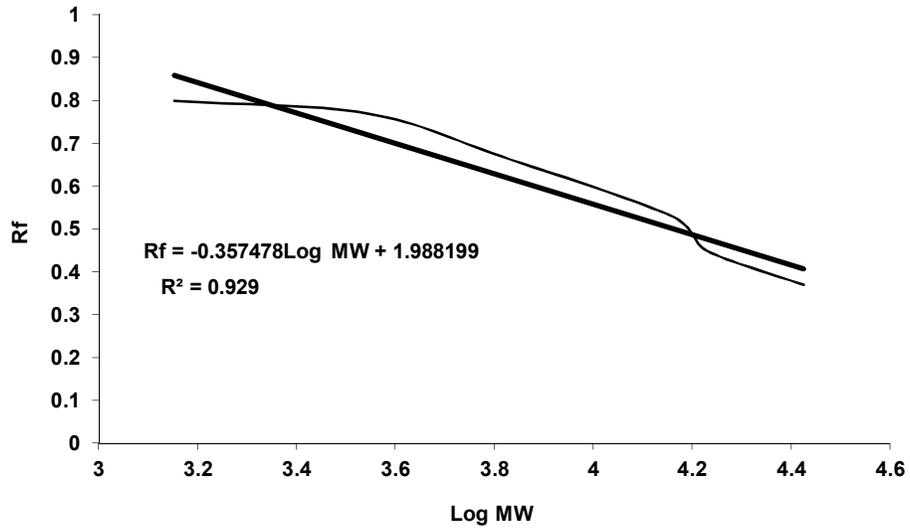
D.0. Curva patrón de sero-albúmina para el cálculo de concentraciones de péptidos solubles por la técnica de Lowry



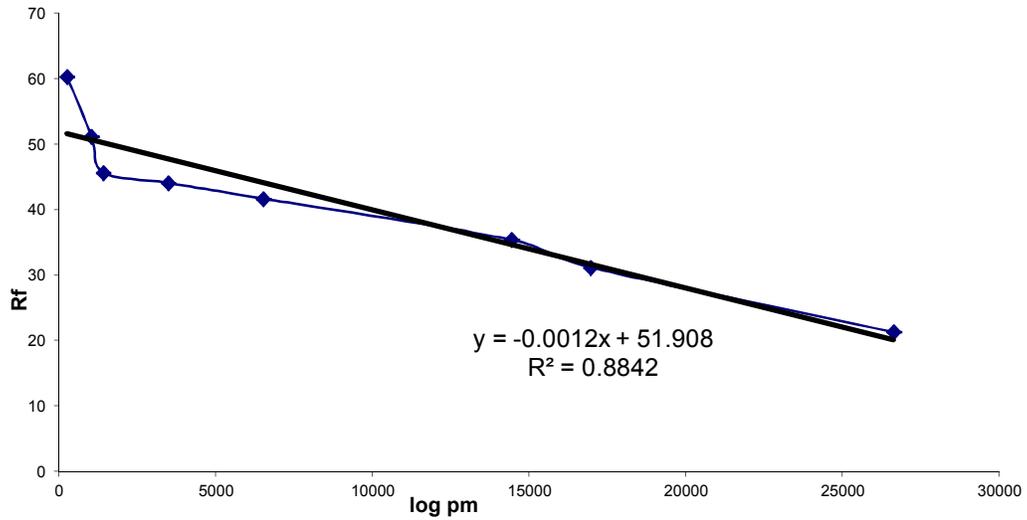
D.1. Curva de calibración para el cálculo de pesos moleculares de péptidos. Patrón de pesos moleculares de amplio rango (Bio Rad).



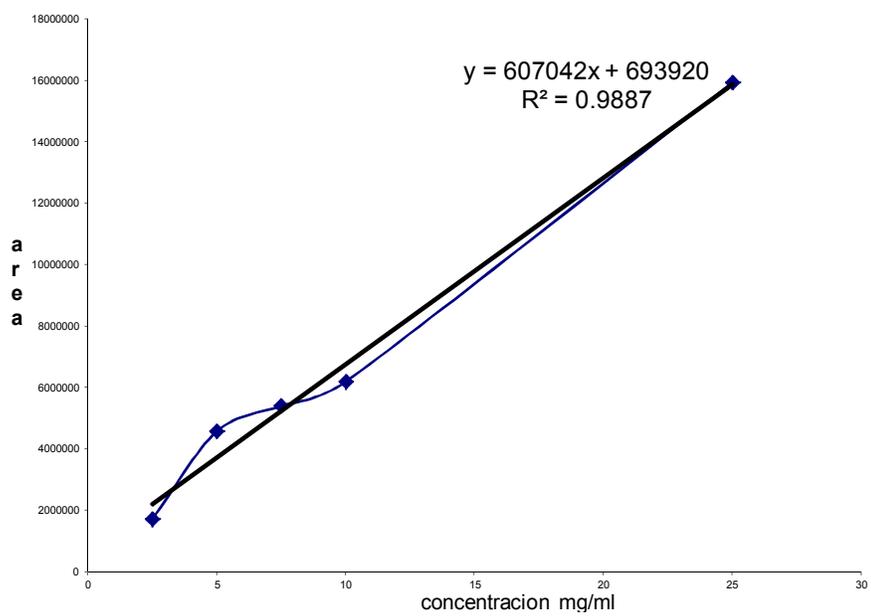
D.2. Curva de calibración para el cálculo de pesos moleculares de péptidos. Patrón de pesos moleculares para péptidos (Bio Rad).



D.3. Curva de calibración para el cálculo de pesos moleculares de péptidos de HPLC en columna de exclusión molecular



D.4. Curva de calibración para el cálculo de concentraciones de péptidos de HPLC en columna de exclusión molecular



Iztapalapa, D.F., a 2 de Mayo de 2011

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

SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS LIBERADOS POR BACTERIAS LÁCTICAS

Que presentó

M.B. Luis Guillermo González Olivares

Director

Dr. José Mariano García Garibay

Jurado

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero
(Presidenta)

Dra. Gabriela Mariana Rodríguez
Serrano (Secretario)

Dra. Isabelle Gaimé Perraud (Vocal)

Dra. Ivonne Figueroa González
(Vocal)

