



Purificación parcial de péptidos bioactivos con actividad antihipertensiva y antitrombótica de una leche comercial fermentada con *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*

TESIS

para obtener el grado de

Doctora en Biotecnología

PRESENTA

**M. B. Karina Nataly Domínguez González**

**DIRECTORA:**

**Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano**

**ASESORES:**

**Dra. Alma E. Cruz Guerrero**

**Dr. Humberto González Márquez**

**Marzo, 2014**

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

México D.F. a 21 de Febrero de 2014

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**Purificación parcial de péptidos bioactivos con actividad antihipertensiva y  
antitrombótica de una leche comercial fermentada con *Lactobacillus casei* Shirota y  
*Streptococcus thermophilus***

que presentó

M. B. Karina Nataly Domínguez González

Director:

Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano

\_\_\_\_\_

Jurado:

Presidente: Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

\_\_\_\_\_

Secretario: Dr. Humberto González Márquez

\_\_\_\_\_

Vocal: Dra. Lilia Areli Prado Barragán

\_\_\_\_\_

Vocal: Dr. José Ramón Verde Calvo

\_\_\_\_\_

## Dedicatorias

---

Este trabajo se lo dedico con mucho cariño:

A mi padre celestial por cada una de las bendiciones que ha derramado sobre mi familia, sobre mi y sobre cada una de las personas que hicieron este momento posible, gracias porque sé que serás siempre tu en mi vida moldeándome como tú quieres que yo sea.

A mis padres por todo su amor incondicional, por enseñarme a luchar por mis sueños y por todos sus consejos y educación, la mejor herencia que me han dado. Los amo...

A mis hermanos, base y pilares para mí. Gracias por todo el amor que me han dado y por todos los momentos compartidos.

A mis amigos quienes me han brindado una amistad sincera sin pedir nada a cambio.

Sobre todo dedico esto a mi esposo Israel por todo su amor y apoyo que me ha dado, gracias por todas esas pláticas que nos hacen desvelarnos pero a la vez crecer como uno solo, gracias por permitirme ser tu ayuda idónea y tu por ser la mía, te amo bb.... A mi nuevo motorcito de motivación mi hijo Ian Marco quien llegó a darle un hermoso giro a mi vida, te amo güerejo.

# Agradecimientos

---

Gracias...

A la Dra. Gaby por todo su apoyo incondicional.

Al Dr. Humberto por la confianza, su apoyo y todas esas pláticas que nos impedían trabajar 😊.

A la Doctora Alma, la Mtra. Lore, el Dr. Ramón y la Dra. Areli por sus consejos y atención.

A todos los de la PP2, por la convivencia en el trabajo, todas las comidas tan ricas y las pláticas tan amenas😊.

A esta casa abierta al tiempo que me ha cobijado durante esta estancia.

## Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar si el producto lácteo fermentado por *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus* (Sofúl®) posee péptidos capaces de inhibir la formación del coágulo de fibrina por la trombina y/o inhibir a la enzima convertidora de angiotensina (ACE). El Sofúl está adicionado con agar, carragenina y gnetina por lo que para su purificación, fue necesario preparar un extracto libre de gomas. Ocho péptidos purificados por cromatografía de exclusión molecular y fase reversa presentaron actividad inhibidora de la ACE y 6 presentaron actividad antitrombótica. Aquellos que presentaron la mayor actividad específica, fueron probados *in vitro* bajo condiciones de digestión enzimática, aunque seis péptidos no fueron aparentemente modificados por las enzimas gástricas, solo tres de ellos conservaron su actividad biológica. Los péptidos 5 y 6 mostraron tanto actividad inhibitoria de la ACE como actividad antitrombótica. El péptido 5 tuvo intervalos de eficiencia de inhibición específica de la ACE y de actividad específica antitrombótica de  $21.3 \% \pm 1.6$  y  $34.8 \% \pm 14.3$  respectivamente. El péptido 6 inhibió la ACE  $24.6 \% \pm 0.1$  y presentó una actividad antitrombótica de  $59.3 \% \pm 15.2$ . Además, el péptido 12 mostró actividad antitrombótica de  $33.82 \% \pm 10.13$  la cual fue conservada después de la digestión con pepsina y tripsina. Este trabajo es solo un acercamiento al estudio de péptidos multifuncionales cuyas bioactividades podrían afectar positivamente al sistema cardiovascular a través del consumo de leches fermentadas que contengan estos péptidos.

## Abstract

---

The aim of this paper is to show that the fermented milk product by *L. casei* Shirota and *Streptococcus thermophilus* (Sofúl®) has peptides that are able to inhibit the fibrin clot formation by thrombin and/or to inhibit angiotensin converting enzyme (ACE). The commercial fermented product contains agar, carrageenan and gelatin, so a step of purification was necessary to prepare an extract free of gums. Eight peptides, which were purified by reversed phase and molecular exclusion chromatography, showed inhibitory activity of ACE and six showed antithrombotic activity. Those that demonstrate the highest specific activity were tested under enzymatic digestion *in vitro*, although six peptides were not apparently modified by the gastric enzymes, only three of them retained its biological activity. Peptides 5 and 6 show the ACE inhibitory activity and antithrombotic. The peptide 5 had an inhibition efficiency ratio of ACE (IER) and antithrombotic activity of  $21.3 \% \pm 1.6 \%$  and  $34.8 \pm 14.3$  respectively. Peptide 6 had an inhibition efficiency ratio ACE  $24.6 \% \pm 0.1$  and antithrombotic activity of  $59.3 \% \pm 15.2$ . Furthermore, peptide 12 showed antithrombotic activity, which was retained after digestion with pepsin and trypsin  $10.13 \pm 33.82 \%$ . This research is just one approach to multifunctional peptides whose bioactivities could affect positively the cardiovascular system through the consumption of fermented milk containing these peptides.

# Índice

---

Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Abstract.....	vii
Índice.....	viii
Índice de Figuras.....	x
Índice de tablas.....	xii
1 Introducción.....	13
2 Antecedentes.....	15
2.1 Las leches fermentadas.....	15
2.1.1 Beneficios de las leches fermentadas.....	16
2.1.2 Bacterias ácido lácticas (BAL).....	17
2.2 Producción de péptidos.....	21
2.2.1 Hidrólisis enzimática.....	22
2.2.2 Sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas durante la fermentación microbiana.....	24
2.3 Péptidos bioactivos.....	28
2.3.1 Péptidos antihipertensivos.....	29
2.3.2 Péptidos antitrombóticos.....	34
2.4 Biodisponibilidad de los péptidos.....	36
3 Objetivos.....	39
3.1 Objetivo general.....	39
3.2 Objetivos particulares.....	39
4 Hipótesis.....	39
5 Justificación.....	40
6 Metodología.....	41

viii



6.1	Obtención del extracto .....	41
6.2	Determinación del grado de hidrólisis y proteína .....	41
6.3	Determinación de azúcares totales. ....	42
6.4	Determinación de la inhibición de la coagulación del fibrinógeno catalizada por la trombina.....	42
6.5	Determinación de la inhibición de ACE .....	43
6.6	Purificación de péptidos .....	43
6.7	Digestión enzimática .....	44
6.8	Análisis estadístico.....	44
6.9	Esquema de trabajo .....	45
6.9.1	Obtención del extracto.....	45
6.9.2	Análisis del extracto tratado con ACN.....	45
7	Resultados y discusión .....	46
7.1	Caracterización del extracto .....	46
7.1.1	Determinación de proteína, grupos amino libres y azúcares totales ....	46
7.1.2	Determinación de la actividad inhibitoria de ACE y antitrombótica.....	50
7.2	Purificación de péptidos .....	53
7.3	Digestión de péptidos.....	63
8	Conclusiones .....	71
9	Bibliografía.....	72

## Índice de Figuras

---

Figura 1.	Modelo del sistema proteolítico de <i>Lactococcus lactis</i> y su regulación..	26
Figura 2.	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.....	31
Figura 3.	Esquema de la interacción entre los subsitios del sitio activo de ACE y el punto de corte del sustrato.....	32
Figura 4.	Péptidos en el cuerpo humano durante la digestión gastrointestinal y absorción en la sangre.....	37
Figura 5.	Proteína total del extracto del Sofúl,.....	47
Figura 6.	Grupos amino libres totales (GAL) del extracto del Sofúl,.....	48
Figura 7.	Azúcares totales del extracto del Sofúl,.....	49
Figura 8.	Actividad Inhibitoria de ACE y de la trombina del extracto de Sofúl con ACN .....	51
Figura 9.	Cromatograma obtenido por filtración en gel (HPLC) del extracto del Sofúl ultrafiltrado. ....	52
Figura 10.	Actividad inhibitoria de ACE y antitrombótica (% Inhibición) de las fracciones del extracto de Sofúl obtenidas de la cromatografía de filtración en gel. ....	56
Figura 11.	Fracciones recuperadas por RP-HPLC de la fracción 13.....	58
Figura 12.	Fracciones obtenidas por RP-HPLC de la fracción 14.....	58
Figura 13.	Fracciones obtenidas por RP-HPLC de la fracción 17.....	59
Figura 14.	Fracciones obtenidas por RP-HPLC de la fracción 24.....	59
Figura 15.	Fracciones obtenidas por RP-HPLC de la fracción 27.....	60
Figura 16.	Actividad inhibitoria de la ACE de las subfracciones con mayor IER obtenidas por RP-HPLC de las fracciones 13,14, 17, 24 y 27.....	61
Figura 17.	Actividad Antitrombótica de las subfracciones con mayor IER obtenidas por RP-HPLC de las fracciones 17, 24 y 27.....	61
Figura 18.	Perfil del péptido 2 antes (negro) y después (azul) de la digestión con pepsina y tripsina.....	65

Figura 19. Perfil del péptido 5 antes (negro) y después (azul) de la digestión con pepsina y tripsina..... 65

Figura 20. Perfil del péptido 12 antes (negro) y después (azul) de la digestión con pepsina y tripsina..... 66

## Índice de tablas

---

Tabla 1. Masa molecular de las fracciones obtenidas por SE-HPLC del extracto de Sofúl® y su comparación con los reportados por otros autores. ....	55
Tabla 2. Péptidos bioactivos purificados por RP-HPLC.....	62
Tabla 3. Pérdida de la actividad inhibitoria de la ACE (%) de los péptidos, después de la digestión con pepsina y tripsina. ....	66
Tabla 4. Pérdida de la actividad antitrombótica (%) de los péptidos, después de la digestión con pepsina y tripsina. ....	67

# 1 Introducción

Los beneficios de la leche en la prevención de infecciones es gracias a los componentes con funciones biológicas, gran parte de esta actividad se ha atribuido a las inmunoglobulinas, pero recientemente se ha reconocido el papel de los oligosacáridos y de otras proteínas de menor importancia, como la lactoferrina y la lactoperoxidasa. Del mismo modo, el calostro es importante para los mamíferos recién nacidos, ya que proporciona la inmunidad necesaria contra las infecciones (Sawyer *et al.*, 2002).

Las proteínas de la leche están sujetas a proteólisis antes y después de la ordeña; la proteólisis en la glándula mamaria es producida por proteasas nativas, como las del sistema plasmina/plasminógeno; por otra parte las proteínas pueden ser sometidas a proteólisis deliberada, como la que se produce durante la manufactura de productos lácteos fermentados (yogurt) y de quesos, tanto en el proceso de elaboración como en su maduración. Finalmente, son hidrolizadas durante el proceso gástrico (Baldi *et al.*, 2005). La hidrólisis de las proteínas de la leche genera una serie de péptidos con propiedades biológicas: antitrombótica, antihipertensiva, antimicrobiana, antioxidante, inmunomodulatoria y opioide, entre otras (Korhonen, 2009). Dicha actividad biológica depende de la secuencia de aminoácidos de cada péptido (Korhonen y Pihlanto, 2006), algunos péptidos derivados de la leche revelan propiedades multifuncionales, es decir, secuencias de péptidos específicos con dos o más bioactividades debido a que algunas regiones en la estructura primaria de las caseínas contienen secuencias superpuestas de péptidos que ejercen diferentes efectos biológicos. Estas regiones son consideradas como "zonas estratégicas" que están parcialmente protegidas de la degradación proteolítica (Meisel, 2004). A la fecha las proteínas de la leche son la fuente principal de péptidos bioactivos, por lo que los productos lácteos fermentados son considerados como una fuente importante (Hartmann y Meisel, 2007). Los fosfopéptidos de las caseínas que son acarreadores de minerales se han sugerido para suplementar productos como el pan, la harina, las bebidas, la goma de mascar, y para algunas preparaciones farmacéuticas como tabletas, pasta de dientes y material para relleno dental.

En este trabajo se purificaron péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y antitrombóticos a partir de un extracto del producto lácteo fermentado

comercial (Sofúl®) libre de gomas; además se evaluó su sensibilidad *in vitro* a la pepsina y a la tripsina. El aporte de esta investigación es la generación de péptidos inhibidores de ACE y antitrombóticos de una fermentación láctica con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus casei* Shirota, como microorganismos iniciadores, los cuales no se habían reportado.

## 2 Antecedentes

### 2.1 Las leches fermentadas

El consumo de las leches fermentadas ha crecido debido a los cambios en los hábitos de alimentación de la población orientados hacia los “alimentos saludables”. El efecto benéfico de las leches fermentadas se obtiene del desarrollo de cultivos seleccionados cuidadosamente, los cuales poseen habilidades que incrementan los efectos nutricionales y saludables. La fermentación de la leche con una microflora específica, va acompañada de modificaciones en el sabor, la textura, la apariencia visual, el color, el aroma y las propiedades nutritivas de la leche, dando lugar a una gran variedad de productos alimenticios (Oberman y Libudzisz, 1998).

Los microorganismos empleados tradicionalmente para la fermentación de la leche son las bacterias ácido lácticas (BAL), ya que son capaces de asimilar la lactosa; poseen un sistema proteolítico débil, que les permite hidrolizar las proteínas de la leche para poder cubrir sus requerimientos nutricionales. Los géneros de BAL empleados principalmente en la producción de leches fermentadas son: *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*; algunas levaduras como *Saccharomyces*, bacterias acéticas como *Acetobacter* y algunos hongos como *Geotrichum candidum* (Nakasawa y Hosono, 1992) también intervienen en la fermentación de la leche. Durante esta fermentación, se producen péptidos entre los que se encuentran aquellos que presentan actividad biológica.

Por lo tanto, los beneficios que aporta el consumo de leches fermentadas, se debe al consumo de los productos metabólicos que resultan de la fermentación, entre los que se encuentran los péptidos con actividad biológica, capaces de influir positivamente en los sistemas fisiológicos. Estos péptidos bioactivos se encuentran en leche, leches fermentadas, quesos y sueros derivados de quesería. Las enzimas de la leche, de bacterias ácido lácticas y de fuentes exógenas contribuyen a su generación (Fuglsang *et al.*, 2003). Además de estos beneficios, en el caso del consumo de leches fermentadas con probióticos, existe un beneficio adicional, que se logra debido a que estos microorganismos inducen cambios en el ambiente intestinal a través de respuestas

inmunitarias locales y sistémicas promoviendo una mejoría en síntomas de intolerancia a la lactosa y en la eliminación de toxinas (Figueroa *et al.*, 2011).

### **2.1.1 Beneficios de las leches fermentadas**

La relación entre la dieta y la salud es muy importante por el efecto que tiene en la prevención de enfermedades y en la promoción de la salud. Los alimentos que pueden beneficiar la salud en una o varias funciones, además de su valor nutritivo, son considerados como alimentos funcionales (Hernández-Ledesma *et al.*, 2010). Los productos lácteos son los que tienen mayor participación en este mercado, debido a que su proceso de fabricación implica la adición de BAL, muchas de las cuales poseen propiedades probióticas y/o producen metabolitos secundarios asociados con efectos sobre la salud (Mills *et al.*, 2011; Stanton *et al.*, 2005). Los productos lácteos pueden actuar como alimentos naturales funcionales en la prevención y/o tratamiento en conjunto con fármacos para el control de la presión arterial, lo que significa que los productos lácteos pueden ser vehículos convenientes para el enriquecimiento con péptidos bioactivos (Séverin y Wenshui, 2005).

Algunos péptidos son capaces de modificar la presión arterial; Meisel (1997) midió la inhibición de la actividad de la enzima convertidora de Angiotensina (ACE) en varios productos lácteos incluyendo leche pasteurizada, yogures, quarg, quesos frescos y maduros. Encontró baja actividad en productos con un bajo grado de proteólisis como el yogur, quarg y quesos frescos. En queso madurado, la actividad era mayor y dependiente del grado de maduración; aunque se observó que por encima de un cierto nivel de maduración del queso, la actividad inhibidora de la ACE disminuyó.

Chen *et al.* (2007) observaron que el hidrolizado de una fermentación de leche con una mezcla de un cultivo comercial inicial de cinco cepas de BAL seguida de hidrólisis con una proteasa microbiana presentó mayor actividad inhibitoria de ACE. Dos tripéptidos (Gly-Thr-Trp y Gly-Val-Trp) fueron identificados con efecto fuerte de inhibición de la ACE y un efecto antihipertensivo del hidrolizado que contiene estos péptidos se demostró en un estudio con ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Donkor *et al.* (2007b) estudiaron la actividad proteolítica de varios cultivos lácteos y cepas probióticas de BAL (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus casei*), todos los cultivos



liberaron péptidos inhibidores de la ACE durante el crecimiento con *Bifidobacterium longum* y la cepa probiótica *L. acidophilus* tuvo el mayor efecto inhibidor de la ACE. Jauhainen *et al.* (2007), demostraron la absorción parcial en la circulación del tripéptido sintético IPP el cual fue radio-marcado y probado en un modelo de rata. Por otra parte, Foltz *et al.* (2007) en un estudio controlado con placebo mostró que el tripéptido IPP de una leche fermentada se absorbió intacto en el intestino y llegó a la circulación en sujetos sanos. Estos estudios demuestran que las leches fermentadas por BAL poseen péptidos con actividad biológica como producto secundario de la fermentación y cuya aplicación a nivel clínico se encuentra en etapas primarias de exploración.

### **2.1.2 Bacterias ácido lácticas (BAL)**

Las BAL constituyen un grupo heterogéneo de bacilos y cocos gram-positivos, aerotolerantes (Holzapfel *et al.*, 2001), pueden ser homofermentativas o heterofermentativas: en la fermentación homofermentativa la glucosa es fermentada a ácido láctico como único producto (>50 % del carbono de azúcar) a través de la glucólisis (Axelsson, 1993); mientras que en la fermentación heterofermentativa normalmente la glucosa es fermentada a ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y acetato a través de la ruta metabólica de la 6-fosfogluconato/fosfoacetolasa (Axelsson, 1993; Salminen *et al.*, 1993; Nakasawa y Hosono, 1992). Las BAL no presentan porfirinas, son catalasa negativas, no son anaerobias estrictas y no llevan a cabo reacciones de transporte oxidativo de electrones dependientes de citocromo, ni el ciclo de Krebs, obteniendo energía por fosforilación a nivel de sustrato. En general, tienen habilidades biosintéticas limitadas y requerimientos nutricionales complejos; se caracterizan por su alta demanda de factores de crecimiento tales como péptidos y aminoácidos específicos, algunas vitaminas, purinas y pirimidinas. La leche no contiene suficientes aminoácidos libres ni péptidos para que estas bacterias puedan crecer, por ello las BAL dependen de su sistema proteolítico para degradar proteínas de la leche y poder crecer en ella (Shihata y Shah, 2000). Su producción de ácido láctico impide la proliferación de otros microorganismos, incluyendo bacterias patógenas (Limsowtin *et al.*, 2002).

Fueron originalmente empleadas para la preservación de los alimentos gracias a la producción de ácido láctico, principalmente con la consecuente disminución del pH y la remoción de carbohidratos (Davidson y Hoover, 1993). Actualmente, se emplean en la

manufactura de leches fermentadas, quesos, fruta, carne y cereales (Kunji *et al.*, 1996; Davidson y Hoover, 1993). Indudablemente, la aplicación más importante de las BAL es como cultivos iniciadores en la manufactura de productos fermentados; las cepas más utilizadas son *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Savijoki *et al.*, 2006; Jay, 2000). A nivel industrial se emplean seis géneros clave de BAL benéficas no patógenas: *Lactococcus* (leche), *Lactobacillus* (leche, carne, verduras, cereales), *Leuconostoc* (vegetación, masas, leche), *Pediococcus* (verduras, carne, leche), *Oenococcus oeni* (vino) y *Streptococcus thermophilus* (leche). En particular, algunas cepas de lactobacilos son probióticas, son parte importante de la microflora del tracto gastrointestinal de humanos y animales ya que proporcionan una serie de beneficios para la salud (Klaenhammer *et al.*, 2007; Soomro *et al.*, 2002; Salminen *et al.*, 1993).

El grupo de las BAL ocupa un papel central en los procesos de manufactura de la industria alimentaria (Caplice y Fitzgerald, 1999; Wood y Holzapfel, 1995), causan la acidificación rápida de la materia prima hasta la producción de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico; además pueden producir ácido acético, etanol, aminoácidos libres, bacteriocinas, exopolisacáridos y varias enzimas (De Vuyst y Leroy, 2007). De esta manera pueden contribuir a mejorar la vida de anaquel e inocuidad; mejoran la textura y contribuyen al perfil sensorial del producto final (Leroy y de Vuyst, 2004).

#### 2.1.2.1 *Lactobacillus*

Varias cepas de lactobacilos se utilizan en la fermentación de alimentos, los ejemplos típicos se encuentran en la industria láctea para la producción de queso, yogurt y otros productos lácteos fermentados. Los lactobacilos son bacterias gram-positivas, no esporulantes, anaerobias; tienen la capacidad de disminuir el pH rápidamente y algunas especies son halotolerantes. Son habitantes normales de la cavidad oral y el tracto digestivo de los seres humanos (Pelletier *et al.*, 1997; Strobel *et al.*, 1989).

Es un bacilo de tamaño mediano de 1-2.5  $\mu\text{m}$  de largo con un diámetro de aproximadamente 0.5  $\mu\text{m}$ , aunque en general su tamaño varía durante el cultivo, a veces en etapas tardías del cultivo se ha llegado a observar células de más de 4  $\mu\text{m}$  de largo. No presenta flagelo o cilios, ni cápsula, su pared celular es de entre 20 y 30 nm de ancho

(Takahashi, 1999). Su pared celular de peptidoglucano contiene L-Lys-D-Asp; su contenido de G+C es de 45-47 % y tiene una relación filogenética basada en su secuencia de rARN 16s con *L. casei* y el grupo *Pediococcus* (Gobbetti, 1999). Crece a temperaturas de 4-50 °C (Elli *et al.*, 2006), sobrevive a pH  $\geq$  2.7, mientras que el número de células viables decrece rápidamente a pH 2.5. Los lactobacilos tienen requerimientos muy complejos para su crecimiento; requieren bajos niveles de oxígeno, carbohidratos fermentables, proteínas, un gran número de vitaminas del complejo B, ácidos grasos insaturados y minerales (Gomes y Malcata, 1999). Requieren de 7 a 15 aminoácidos esenciales como fuente de nitrógeno para su crecimiento (Strobel *et al.*, 1989): arginina, leucina, isoleucina, metionina, lisina, valina, glutamato, aspartato, tirosina, treonina, triptófano, y en algunos casos, alanina, histidina, prolina, glicina y serina (Khalid y Marth, 1990).

*L. casei* pertenece al grupo de microorganismos heterofermentativos facultativos. Las hexosas son casi completamente convertidas en ácido L-áctico como producto predominante de la fermentación a través de la ruta de Embden-Meyerhof y las pentosas son usadas para inducir la fosfocetolasa para producir ácido láctico y ácido acético (Gobbetti 1999; Morishita y Deguchi, 1999). Algunas especies de *L. casei*, aisladas de hábitats diferentes producen exopolisacárido (EPS) cuya producción y composición son influenciadas por la disponibilidad de fuentes de carbono; siendo la glucosa, la ramnosa y trazas de galactosa y arabinosa, los componentes principales de su EPS (Gobbetti, 1999).

En cuanto al sistema proteolítico de *Lactobacillus casei*, en estudios genéticos se ha encontrado una alta similitud con la PrtP de *Lactococcus lactis*, sugiriendo que los sistemas son similares (Kunji *et al.*, 1996).

*L. casei* Shirota se ha usado ampliamente en la industria alimentaria como un probiótico debido a que es más resistente que otras BAL a pH bajo; lo que le permite sobrevivir al jugo gástrico (Kandler y Weiss, 1986). Muestra resistencia espontánea a 12 agentes antibacteriales, curiosamente los más usados en tratamiento clínico (Yakult Central Institute, 1999). Entre los efectos reportados para este microorganismo se encuentran: prevención de desordenes intestinales, balance de la flora intestinal, reducción de actividad de las enzimas fecales y efectos positivos sobre cáncer superficial de vejiga.

### 2.1.2.2 *Streptococcus*

*Streptococcus thermophilus* es un coco no móvil, esférico, gram-positivo, anaerobio facultativo, catalasa negativo y con un diámetro de 0.7-0.9  $\mu\text{m}$ ; se presenta en pares o cadenas, algunas de las cuales pueden ser muy largas. Presenta un crecimiento óptimo entre los 40-45°C de, un mínimo, a 20-25°C y un máximo, a 47-50°C; aunque es termorresistente a 60°C hasta por 30 min. Crece poco en presencia de 2 % NaCl, aunque existen especies que toleran 4 %. Es homofermentativa produciendo principalmente L-ácido láctico, por medio de la vía de Embden-Meyerhof. Fermenta un número limitado de azúcares como: lactosa, fructosa, sacarosa y glucosa, tiene una preferencia distintiva por disacáridos como la lactosa y sacarosa; en medios de monosacáridos su crecimiento es menor. Generalmente no fermenta galactosa y no utiliza arginina (Zirnstein y Hutkins, 1999). Su contenido de G+C es de 37-40 % y tiene una moderada homología filogenética con *Lactococcus*. Se caracteriza también por ser relativamente sensible a los antibióticos. Es el único, entre los *Streptococcus*, que no tiene un antígeno de grupo específico (Pearce y Flint, 2002).

Además de una fuente fermentable de carbohidratos, necesita hidrolizados de proteína como fuente de aminoácidos libres para su crecimiento, entre ellos: ácido glutámico, histidina, metionina, cisteína, valina, leucina, isoleucina, triptófano y tirosina (Garault *et al.*, 2000; Akpemado y Bracquart, 1983). Por otra parte la mayoría de las vitaminas y otros requerimientos nutrimentales son aportados por la adición de extracto de levadura (Zirnstein y Hutkins, 1999).

*Streptococcus thermophilus* es considerada como la segunda bacteria más importante de la industria de las BAL después de *Lactococcus lactis* (De Vuyst y Tsakalidou, 2008). Además de los usos tradicionales en combinación con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en el yogurt, *S. thermophilus* se utiliza para producir quesos como el Suizo, el Brick, el Parmesano, el Provolone, el Mozzarella y el Aiago. También se ha utilizado recientemente para la producción de queso Cheddar en combinación con microorganismos iniciadores mesófilos. El papel de *S. thermophilus* en la fermentación de la leche no sólo se relaciona con la producción de ácido láctico, la cual es muy rápida, sino que también tiene otras propiedades tecnológicas importantes, tales como el metabolismo del azúcar, la utilización de la galactosa, las actividades proteolítica y ureasa

(Iyer *et al.*, 2010). Algunas cepas de *S. thermophilus* que producen exopolisacárido (EPS) se han estudiado ampliamente puesto que el EPS producido actúa *in situ* como bio-espesante natural que mejora la textura de los alimentos fermentados (Svensson *et al.*, 2005); *S. thermophilus* produce un heteropolisacárido compuesto principalmente de galactosa, glucosa y ramnosa, aunque también se han identificado N-acetil-galactosamina, fucosa, y galactosa acetilada (Broadbent *et al.*, 2003).

En los trabajos de Letort *et al.* (2002), Moreira *et al.* (2000) y Rajagopal y Sandine (1990) se demostró una relación simbiótica entre *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*: *L. bulgaricus* libera aminoácidos y péptidos que estimulan el crecimiento de *S. thermophilus*, mientras que *L. bulgaricus* se ve favorecido por la producción de ácido láctico, ácido pirúvico, ácido fórmico y CO<sub>2</sub> por parte de *S. thermophilus* (Courtin y Rul *et al.*, 2004; Otte *et al.*, 2003). Esta cooperación es una relación positiva que tiene un efecto benéfico sobre el crecimiento bacteriano y sobre la producción de ácido láctico y compuestos aromáticos (Courtin y Rul *et al.*, 2004).

El sistema proteolítico de *Streptococcus thermophilus* es más limitado que la mayoría de otros cultivos iniciadores (Letort *et al.*, 2002), razón por la cual se usa en conjunto con bacterias del género *Lactobacillus* las cuales son más proteolíticas. Sin embargo, varias de las enzimas de su sistema proteolítico se han descrito incluyendo aminopeptidasas, una dipeptidasa, una tripeptidasa y una endopeptidasa (Garault *et al.*, 2002; Fernández-Espla y Rul, 1999; Tsakalidou *et al.*, 1999).

También se ha demostrado una probable actividad probiótica de *S. thermophilus* ya que sobrevive al tránsito gastrointestinal (GI) moderado, se adhieren a células epiteliales intestinales (Elli *et al.*, 2006; Lick *et al.*, 2001), desconjuga las sales biliares, y presenta actividad de β-galactosidasa (Vinderola y Reinheimer, 2003; Sreekumar y Hosono, 2000).

## **2.2 Producción de péptidos**

Las proteínas pueden ser adicionadas como ingredientes funcionales a los alimentos (Pihlanto y Korhonen, 2003) debido a que estas ejercen su acción fisiológica directamente o después de hidrólisis enzimática *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, pueden actuar como fuente de péptidos biológicamente activos, los cuales son producidos a partir de proteínas de varios alimentos durante la digestión gastrointestinal y la fermentación de

los materiales de los alimentos con bacterias ácido lácticas (Korhonen y Pihlanto, 2006). Una vez liberados, pueden presentar funciones diversas. A las proteínas de la leche se les considera como la fuente más importante de péptidos bioactivos (Korhonen, 2009), aunque los péptidos bioactivos se pueden obtener de otras fuentes: gelatina, carne, huevos, atún, sardina, arenque, salmón, trigo, maíz, soya, arroz, setas, calabaza y sorgo (Möller *et al.*, 2008).

Los péptidos bioactivos son fragmentos de proteína específicos que tiene un impacto positivo en las funciones o condiciones del cuerpo y al final tienen influencia en la salud (Kitts y Weiler, 2003). El tamaño de las secuencias activas puede variar de 2 a 20 residuos de aminoácidos y su actividad (opioide, antihipertensiva, antitrombótica, hipocolesterolemica, inmunomodulatoria, anticarcinogénica o acarreadora de minerales) depende de la composición y secuencia de aminoácidos (Erdmann *et al.*, 2008; Hartmann y Meisel, 2007; Séverin y Wenshui, 2005; Hernandez-Ledesma *et al.*, 2004). Algunos péptidos se conocen por tener múltiples propiedades funcionales (Korhonen, 2009; Meisel, 2004), es decir, tienen más de una actividad (Hartmann y Meisel, 2007). Esto se debe a que muchos péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche se producen en la misma región de la proteína intacta; a estas regiones se les considera como zonas "estratégicas" y pueden estar parcialmente protegidas de la degradación proteolítica (Fitzgerald y Murray, 2006; Meisel, 1998).

Los péptidos de la leche se han producido por hidrólisis enzimática con enzimas digestivas derivadas de animales, microorganismos o plantas (Phelan *et al.*, 2009). En varios estudios se ha demostrado que una combinación de los métodos anteriores puede ser efectiva en la generación de péptidos funcionales de muy baja masa molecular (Muro *et al.*, 2011); por ejemplo en la fermentación de suero de leche se han utilizado enzimas adicionales como estrategia para maximizar la liberación de péptidos (Nielsen *et al.*, 2009; Ortiz *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2008; Quirós *et al.*, 2007).

### **2.2.1 Hidrólisis enzimática**

La manera más común para producir péptidos bioactivos es a través de la proteólisis enzimática (Korhonen, 2009; Möller *et al.*, 2008). Se han empleado enzimas tales como las gastrointestinales, pepsina, tripsina y quimotripsina, las cuales han demostrado que

liberan péptidos con actividades biológicas diversas, entre ellas: antihipertensiva, de unión a calcio (CPP), antibacteriana, inmunomoduladora y opioide (FitzGerald *et al.*, 2004; Meisel y FitzGerald, 2003; Yamamoto *et al.*, 2003). También se han utilizado enzimas de fuentes bacterianas y fúngicas (*A. orizae*) como la alcalasa, la termolisina y la alcalasa K (Muro *et al.*, 2011).

Durante la hidrólisis enzimática se tienen que tomar en cuenta, sobre todo, la temperatura y el pH ya que afectan la capacidad hidrolítica de las enzimas (Cheison *et al.*, 2010). Además, la proteólisis depende del tiempo, lo que se refleja en la cantidad de péptidos generados y puede ser que también se pierda la actividad si hay una hidrólisis excesiva. Con el fin de establecer la relación entre el tiempo de hidrólisis y el nivel de bioactividad, se han realizado curvas de cinética de degradación de proteínas de leche (Miguel *et al.*, 2009; Brandelli *et al.*, 2008; Miguel *et al.*, 2007; Quirós *et al.*, 2007; Miguel *et al.*, 2005; Hernández-Ledesma *et al.*, 2002).

De la misma forma, el daño mecánico que se genere sobre la proteína podría afectar negativamente, esto debido a que se puede alterar el perfil de los péptidos liberados durante la digestión gastrointestinal, ya que las enzimas pueden hidrolizar partes de la proteína que antes eran inaccesibles a la acción enzimática y por consiguiente disminuir la actividad biológica (Phelan y Kerins, 2011). Por otra parte, Knudsen *et al.* (2002) demostraron que el uso de alta presión para desdoblar parcialmente las proteínas de suero, antes o durante la proteólisis, aumenta la tasa de proteólisis y altera la proporción relativa de los péptidos formados.

Además, el empleo de la ultrafiltración podría ser esencial para separar los péptidos deseados, por ejemplo el tamaño de la mayoría de los inhibidores de la ACE es menor de 3 kDa por lo que una ultrafiltración con un corte de 3 o 5 kDa sería adecuado (Jiang *et al.*, 2010; Fitzgerald *et al.*, 2004). Una buena generación de péptidos va a depender de la enzima empleada, de las condiciones de pH y temperatura así como del tiempo de proteólisis para obtener una máxima producción de péptidos. (Agyei y Danquah, 2011).

### 2.2.2 Sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas durante la fermentación microbiana

Un método importante de la producción de péptidos es la fermentación de la leche a través de la proteólisis microbiana por cultivos iniciadores lácticos. La proteólisis microbiana es muy específica y conduce a la liberación de muchos péptidos bioactivos procedentes de proteínas de leche, especialmente las caseínas (Muro *et al.*, 2011).

La producción de péptidos empieza con la proteólisis deliberada de las proteínas, como la proteólisis que ocurre durante la fabricación de productos lácteos fermentados (yogur) y la fabricación de queso o durante el proceso de maduración. La degradación proteolítica de las proteínas genera una serie de péptidos dotados de diferentes propiedades biológicas (Baldi *et al.*, 2005). Actualmente, los procesos de manufactura de ciertos productos han sido modificados ya sea por la adición de péptidos con propiedades funcionales o por el cambio en los cultivos iniciadores (Muro *et al.*, 2011; Phelan *et al.*, 2009).

El sistema proteolítico de las BAL digiere principalmente a las caseínas, lo que además de proveer de aminoácidos esenciales a las células, también tiene un gran interés industrial debido a que contribuye al desarrollo de propiedades organolépticas de los productos fermentados. El sistema proteolítico más estudiado es el de *Lactococcus lactis* y se ha tomado como modelo para la proteólisis de las caseínas (Savijoki, 2006). La proteólisis es un proceso en cascada que involucra numerosos componentes, tales como 1) la proteasa extracelular para la degradación inicial de las proteínas en oligopéptidos, 2) el sistema de transporte para la absorción de los oligopéptidos, 3) peptidasas intracelulares para la degradación de los oligopéptidos en péptidos de tamaño menor y aminoácidos y 4) enzimas para la conversión de los aminoácidos en componentes volátiles responsables del sabor (Siezen, 1999).

La degradación de caseínas se inicia por una serina-proteinasa monomérica unida a la pared celular (CEP), con una masa molecular de entre 180-190 kDa (Fig. 1). Según sus perfiles de degradación, las proteinasas de *L. lactis* se dividieron en 2 grupos: las tipo P<sub>I</sub> cuyo sustrato principal es la  $\beta$ -caseína y las tipo P<sub>III</sub>, que degradan a la  $\alpha$ s<sub>1</sub>,  $\beta$  y  $\kappa$ -caseínas por igual (Kunji *et al.*, 1996). Proteinasa de varias BAL se han caracterizado; entre éstas



se encuentran la PrtP de *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus paracasei* (Holck y Naes, 1992), PrtH de *Lactobacillus helveticus* (Pederson *et al.*, 1999), la PrtR de *Lactobacillus rhamnosus* (Pastar *et al.*, 2003), la PrtS de *Streptococcus thermophilus* (Fernández-Espla *et al.*, 2000) y la PrtB de *Lactobacillus bulgaricus* (Gilbert *et al.*, 1996). Las bacterias ácido lácticas poseen típicamente sólo una proteinasa, sin embargo en *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus bulgaricus* se reportó la presencia de dos (Savijoki, 2006). El rango y grado de autólisis depende de la especificidad, localización y cantidad de la proteinasa. Fernandez-Espla *et al.* (2000) encontraron que para *S. thermophilus*, su proteinasa tiene una especificidad intermedia entre la proteinasas tipo P<sub>I</sub> y P<sub>III</sub> descritas para *L. lactis*. La  $\beta$ -caseína se degrada por las proteinasas de tipo P<sub>I</sub> en más de 100 diferentes oligopéptidos, formando fragmentos relativamente grandes que se encuentran en un intervalo de 4 a 30 residuos de aminoácidos (Juillard *et al.*, 1995); mientras que la degradación de la caseína  $\alpha_1$  produce aproximadamente 25 oligopéptidos (Kunji *et al.*, 1996).

Las CEPs cuentan con varios dominios; el dominio catalítico (PR) está formado por ~500 residuos; un dominio de inserción (I) de ~150 residuos que posiblemente modula la especificidad de sustrato de la CEP y un dominio B de ~500 residuos que no es indispensable para la actividad proteolítica ya que está ausente en la CEP de estreptococos; pero se encuentra en la mayoría de las CEPs y, posiblemente, esté involucrado en la estabilización de la PrtP (Fernandez-Espla *et al.*, 2000; Siezen, 1999).

En las BAL, la actividad de las proteinasas se inhibe cuando el medio de cultivo contiene hidrolizado de caseína que principalmente se compone de péptidos y se incrementa cuando no lo contiene (Kunji *et al.*, 1996). En estudios recientes se observó que las seis unidades transcripcionales *prtP*, *prtM*, *opp-pepO1*, *pepD*, *pepN*, *pepC*, y *pepX* (Fig. 1), se reprimen de 5 a 150 veces cuando se adiciona hidrolizados de caseína con 80 % de péptidos y 20 % de aminoácidos al medio de cultivo y en condiciones limitantes de nitrógeno (Guédon *et al.*, 2001).

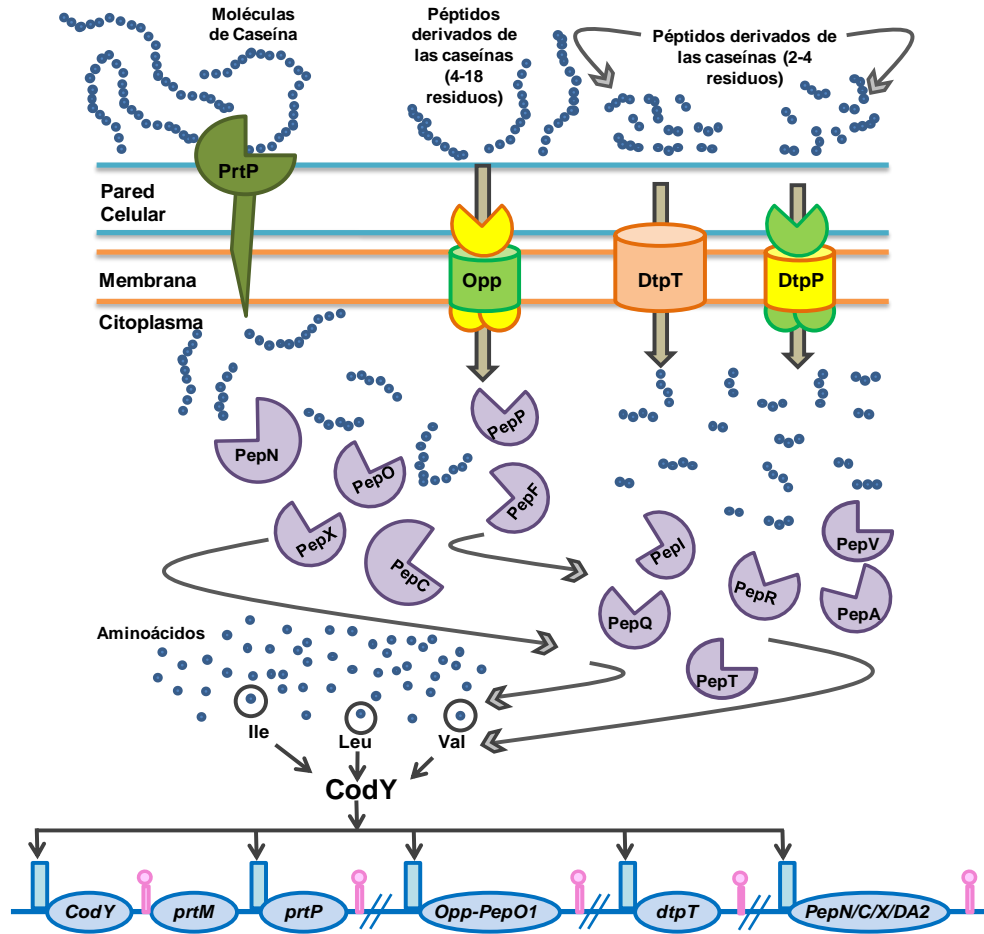


Figura 1. Modelo del sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* y su regulación. Está compuesto por una proteinasa (PrtP), por el sistema de transporte para los péptidos a través de la membrana citoplasmática (Opp para oligopéptidos, DtpT para di y tripéptidos y DtpP para di, tri y tetrapéptidos) y por las péptidasas específicas a prolina (PepX, PepI, PepP, PepQ, PepR), generales (PepO, PepF, PepC, PepN, PepT, PepV) y específica para ácido glutámico (PepA). El represor transcripcional CodY utiliza como cofactores a los aminoácidos isoleucina, leucina y valina (adaptado de Savijoki *et al.* 2006).

En la figura 1, se muestra el modelo que representa el sistema proteolítico de *L. lactis* y su regulación. El regulador transcripcional CodY regula negativamente la expresión de varios componentes del sistema proteolítico y la fuerza de represión es a su vez modulada por los aminoácidos de cadena ramificada incluyendo isoleucina, leucina y valina (Petranovic *et al.*, 2004). El mecanismo regulatorio del sistema proteolítico en *Lactobacilli* ha sido menos estudiado; se demostró que la concentración de péptidos en el

medio regula la biosíntesis de PrtH y PrtR en *Lactobacillus helveticus* y en *Lactobacillus rhamnosus* respectivamente (Hebert *et al.*, 2000; Pastar *et al.*, 2003).

Los sistemas de transporte de aminoácidos se acoplan con una fuerza motriz de protones o por un sistema de gradiente de concentración de los solutos (Kunji *et al.*, 1996). El sistema de transporte de oligopéptidos más estudiado es el Opp (en *Lactococcus lactis*). Las proteínas Opp pertenecen a una familia muy conservada de transportadores unidos a ATP que regulan el consumo de los péptidos derivados de las caseínas, se encuentran en un solo operón; la OppA es la proteína encargada de unirse a los oligopéptidos, OppB y OppC son proteínas integrales de membrana y OppD y OppF son fijadoras de nucleótidos (Savijoki, 2006). El sistema Opp de otras BAL no ha sido estudiado pero se ha reportado que en *Lactobacillus bulgaricus*, la estructura del sistema Opp es similar al descrito para *Lactococcus* (Kunji *et al.*, 1996; Savijoki, 2006).

El sistema de transporte de oligopéptidos (Ami) de *S. thermophilus* está compuesto de dos proteínas integrales de membrana (AmiC y AmiD), dos proteínas fijadoras de ATP (AmiE y AmiF) y la proteína que se une al sustrato (AmiA1, AmiA2 ó AmiA3) (Iyer, *et al.* 2010).

DtpT es un transportador secundario perteneciente a la familia PTR de transportadores de péptidos (Doeven *et al.*, 2005). Por otra parte el sistema dependiente de ATP o relacionado con intermediarios fosforilados ricos en energía es un transportador ABC conformado por dos péptidos de unión a proteínas (DppA y DppP), dos proteínas integrales de membrana (DppB y DppC) y dos proteínas de unión a nucleotidos (DppD y DppF) (Sanz *et al.*, 2001, 2003).

Las proteínas de unión a los oligopéptidos determinan la especificidad del sistema de transporte y, por lo tanto, la variedad de péptidos que pueden entrar en la célula (Picon *et al.*, 2010). OppA transporta péptidos que van en tamaño de 4 a 35 aminoácidos, los que presentan residuos hidrofóbicos y aromáticos se unen con mayor afinidad que los que contienen prolina, glicina y aminoácidos cargados negativamente ya que muestran la más baja afinidad (Detmers *et al.*, 2000); mientras que el sistema Ami en *Streptococcus* tiene la capacidad para tomar grandes péptidos no ácidos, de hasta por lo menos 23 residuos (Juille *et al.*, 2005).

Finalmente, los sistemas secundarios de transporte en las BAL también tienen su especificidad; DtpT se encarga de la incorporación de dipéptidos y tripéptidos hidrofílicos (Doeven *et al.*, 2005); mientras que para DtpP, las proteínas de unión a los péptidos DppA y DppP son muy similares, ambas se unen con di-, tri- y tetrapéptidos formados por residuos básicos e hidrofóbicos con mayor afinidad, pero también aceptan péptidos neutros y ácidos (Savijoki *et al.*, 2006; Sanz *et al.*, 2001, 2003).

Las peptidasas degradan a los oligopéptidos en péptidos y aminoácidos. Estas enzimas se han purificado a partir de *S. thermophilus* y de varias cepas de *Lactococcus* y *Lactobacillus*; su caracterización ha demostrado que difieren en especificidad (Savijoki *et al.*, 2006). Las endopeptidasas intracelulares, aminopeptidasas generales (PepN y PepC) y la dipeptidil aminopeptidasa X-prolil (PepX) son las primeras enzimas en actuar sobre los oligopéptidos; poseen la capacidad para hidrolizar la caseína intacta, aunque también hidrolizan enlaces peptídicos internos de los péptidos derivados de caseína. Otras peptidasas son la metalopeptidasa de amplia especificidad (PepN) y la peptidasa para cisteína (PepC) (Kunji *et al.*, 1996). Los di y tripéptidos generados por las endopeptidasas y aminopeptidasas generales así como la PepX son, posteriormente, sometidos a la actividad de la tripeptidasa (PepT) y las dipeptidasas (PepV y PepD); las cuales tienen preferencia por residuos aminoácidos hidrofóbicos como leucina, metionina, fenilalanina ó glicina (Kunji *et al.*, 1996; Klein *et al.*, 1995). Otras peptidasas con diferentes especificidades incluyen: PepA, que libera residuos aminoácidos del extremo amino terminal a partir de péptidos que son de tres a nueve residuos; PepP, que prefiere tripéptidos con prolina en la posición media; PepR y PepI que actúan sobre dipéptidos que contienen prolina en la penúltima posición; PepQ, que rompe dipéptidos con prolina en la segunda posición y PepS, que muestra preferencia por péptidos con dos a cinco residuos aminoácidos con Arg o residuos aromáticos en el extremo amino terminal (Fernández-Espla *et al.*, 1999; Kunji *et al.*, 1996).

## 2.3 Péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos son fragmentos de proteína específicos que tiene un impacto positivo en algunas funciones del cuerpo y por lo tanto influyen en la salud (Kitts y Weiler, 2003). El tamaño de las secuencias activas puede variar de 2 a 20 residuos de aminoácidos y su actividad (opioide, antihipertensiva, antitrombótica, hipocolesterolemica,

inmunomodulatoria, anticarcinogénica o acarreadora de minerales) depende de la composición en aminoácidos así como de la secuencia de los mismos (Erdmann, *et al.* 2008; Hartmann y Meisel, 2007; Séverin y Wenshui, 2005; Hernandez-Ledesma, *et al.* 2004).

Estas moléculas pueden afectar a los principales sistemas fisiológicos (cardiovascular, digestivo, inmunológico y nervioso) y producir efectos biológicos en el cuerpo que contribuyan a la salud y bienestar (Quirós *et al.*, 2009). Por ejemplo, pueden disminuir la presión arterial, inhibir la actividad de endopeptidasas específicas de prolina, estimular las funciones del sistema inmunológico, actuar con actividad agonista y antagónica opioide, inducir las contracciones de los músculos lisos, inhibir el proceso de agregación plaquetaria, inhibir la actividad de proteinasa del VIH y de los procesos de oxidación, presentar actividad antibacteriana y fungicida, atrapar iones metálicos y participar en el transporte de minerales. Por otra parte, también pueden participar en la modificación de atributos sensoriales y en la modificación del valor nutritivo de los alimentos (Dziuba y Darewics, 2007).

### **2.3.1 Péptidos antihipertensivos**

La hipertensión arterial es un síndrome complejo, genético o adquirido, con diferentes implicaciones metabólicas, electrolíticas y a nivel de membrana celular. Es el incremento continuo y patológico de la presión que ejerce la sangre sobre los vasos sanguíneos con valores por arriba de 140/90 mmHg (Torruco-Uco *et al.*, 2008). Es el factor de riesgo cardiovascular más común; causa daño vascular no solo de forma local en el corazón, sino también vascular periférico, cerebral, renal o pulmonar. La prevalencia depende del país, sin embargo, algunas encuestas indican que del 10 al 20 % de la población mundial padecen hipertensión (cerca de un billón de personas) y es el primer factor de riesgo de muerte en todo el mundo; además, la morbilidad ocurre debido a que la hipertensión afecta numerosos órganos blanco, incluyendo cerebro, ojos, corazón, arterias y riñones (Mazón-Ramos *et al.*, 2009).

El sistema de regulación de la presión arterial es muy complejo (Tang y Vanhoutte, 2010), uno de los sistemas que la regulan es el Sistema Renina–Angiotensina–Aldosterona (Fig. 2). Éste consiste en disminuir la presión sanguínea a través de la

prevención de la formación del vasoconstrictor angiotensina II y la activación del vasodilatador bradiquinina (Crystal *et al.*, 2008). El sistema renina-angiotensina-aldosterona controla la presión sanguínea, el volumen corporal de líquidos y el balance electrolítico a través de acciones coordinadas sobre el corazón, arterias y riñones. Este sistema comienza con la secreción de la proteasa renina (EC 3.4.23.15) por el riñón, encargada de transformar el angiotensinógeno en angiotensina I. Ésta última, tiene un efecto débil sobre la regulación de la presión sanguínea, en los pulmones es transformada por la enzima convertidora de angiotensina (ACE) (EC 3.4.15.1) en angiotensina II, un potente vasoconstrictor. ACE es una metalopeptidasa unida a zinc que se une al extremo C-terminal de una variedad de péptidos, liberando dipéptidos; es el factor de regulación más importante del sistema renina-angiotensina-aldosterona (Pihlanto *et al.*, 2010). Además de la conversión de angiotensina I en angiotensina II, la ACE inactiva al péptido vasodilatador bradiquinina (Fig. 2) (Mizuno *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2003; Takano, 2002). Por lo tanto este sistema disminuye la presión arterial a través de dos mecanismos: el primero previene la formación de angiotensina II y el segundo mantiene las propiedades hipotensivas de la bradiquinina (Leclerc *et al.*, 2002), que, además de controlar la presión arterial, incrementa la síntesis de prostaglandina y de óxido nítrico (NO), provocando vasodilatación y la resistencia vascular periférica disminuyendo la presión arterial (Pehlan y Kerins, 2011).

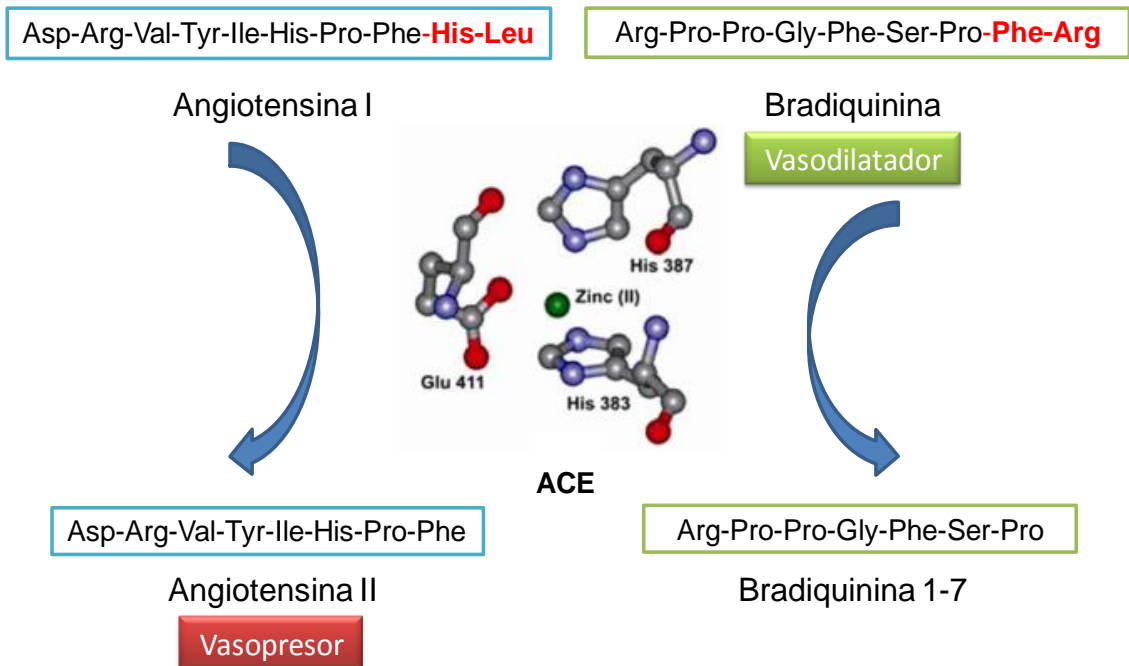


Figura 2. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona. ACE cataliza la conversión de angiotensina I en angiotensina II y bradiquinina en bradiquinina 1-7 (adaptado de Bhuyan y Mugesh, 2011).

En los últimos diez años se ha planteado la posibilidad de producir alimentos e ingredientes con péptidos bioactivos para ayudar en el tratamiento y prevención de la hipertensión (Ortíz-Chao *et al.*, 2009; Nielsen, *et al.* 2009; Fitzgerald *et al.*, 2004). Actualmente, el aumento en el consumo de los productos lácteos fermentados alrededor del mundo, se debe al creciente auge del consumo de alimentos naturales, nutritivos y con efectos sobre la salud (Yamamoto *et al.*, 2003; Takano, 2002). Se ha demostrado que algunas leches fermentadas contienen péptidos inhibidores de la ACE que se producen gracias al sistema proteolítico de las BAL, y en casos particulares, por la adición de enzimas digestivas (Hernández-Ledesma *et al.*, 2004; Fuglsang *et al.*, 2003; Leclerc *et al.*, 2002; Rokka *et al.*, 1997). Estudios epidemiológicos demuestran que hay una relación entre el consumo de productos lácteos fermentados y la disminución de la presión arterial (Boelsma y Kloek, 2009; Mizuno *et al.*, 2005; Seppo *et al.*, 2003; Hata *et al.*, 1996). Ya se encuentran disponibles algunos productos en el mercado, como leches fermentadas o como hidrolizados de proteína, comercializados como ingredientes funcionales para

promover el efecto de los péptidos hipotensivos derivados de las proteínas de la leche (Fitzgerald *et al.*, 2004).

Los péptidos inhibidores de ACE se producen por hidrólisis enzimática de las proteínas de la leche, por la fermentación de ésta con varios microorganismos o por síntesis química (Leclerc *et al.*, 2002). Los péptidos con un aminoácido aromático como la fenilalanina en la antepenúltima posición, generalmente de cadena corta y con un residuo de prolina en el extremo carboxilo terminal, son mejores inhibidores de la ACE que aquellos con residuos aminoácidos básicos (Phelan y Kerins, 2011). Esta conformación se caracteriza por resistir la degradación por enzimas digestivas y de este modo permite su absorción en el intestino delgado hacia el torrente sanguíneo (Donkor *et al.*, 2007). La región del sitio activo de la enzima, el subsitio S1, es de naturaleza hidrofóbica (Pavar *et al.*, 2006) puede ser ocupado por fracciones lineales o cíclicas (Val, Ile, Leu) en P1' (Bala *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha reportado que el subsitio S1' no interactúa con Pro pero si con Lys, mientras que el subsitio S2' no tolera cadenas laterales de aminoácidos dicarboxílicos pero puede ser ocupado por Pro (Otte *et al.*, 2007; Bala *et al.*, 2002; Zola y Horovitz, 1981) ACE hidroliza el puente entre los residuos del sustrato que ocupan los subsitios S1 y S1', como se muestra en la figura 3 (Bala *et al.*, 2002).

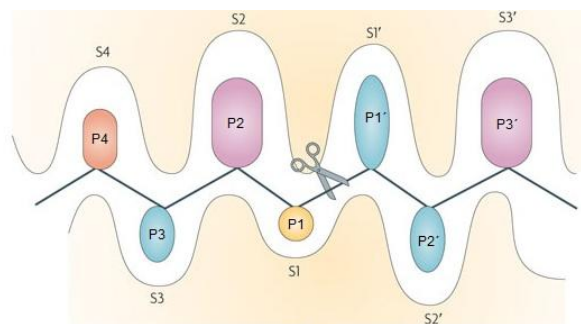


Figura 3. Esquema de la interacción entre los subsitios del sitio activo de ACE y el punto de corte del sustrato (adaptado de Drag y Salvensen, 2010).

Wu *et al.* (2006 a y b) propusieron un modelo de la estructura molecular de los péptidos y lo relacionaron con la actividad inhibitoria de ACE; para los dipéptidos, la ACE prefiere aminoácidos con cadenas laterales pesadas o hidrofóbicas; para tripéptidos, prefiere residuos de aminoácidos con grupos aromáticos, cargados positivamente e hidrofóbicos en la primera, segunda y tercera posición del extremo carboxilo terminal



respectivamente; y para péptidos de 4-10 residuos de aminoácidos, el tetrapéptido, más que el tripéptido, del extremo carboxilo terminal, es la clave para una inhibición efectiva de la enzima, prefiriendo el Trp en la cuarta posición. Cuando una Arg se encuentra en el extremo carboxilo terminal (con carga positiva) o una Lys (con carga positiva) contribuyen al potencial de inhibición (Phelan y Kerins, 2011).

La conformación, tiene un efecto directo sobre la preferencia de la ACE por su sustrato, es decir, péptidos con una conformación *trans*-Pro son mejores sustratos para la ACE que aquellos con conformación *cis*-Pro, debido a la estructura del inhibidor y a su interacción con el sitio activo, ya que el cambio *trans*-Pro a *cis*-Pro causa un desplazamiento del grupo carbonilo del inhibidor al lado opuesto de la cadena del péptido perdiendo su enlace original de puente de hidrogeno con la enzima, lo que lleva a una pérdida de interacción con el sitio activo (Dawson *et al.* 1989; Merker *et al.* 1999).

#### 2.3.1.1 Efecto antihipertensivo de péptidos derivados de la leche y leches fermentadas

Takano (2002) purificó dos tipos de péptidos: Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro a partir de una leche fermentada; con valores de IC<sub>50</sub> de 9 y 5 µmol/L respectivamente. La secuencia Val-Pro-Pro se encuentra en la estructura primaria de la caseína β (f(84-86)) y la secuencia Ile-Pro-Pro, en la caseína β (f(74-76)) y caseína κ (f(108-110)). Estos péptidos son los que presentan la mayor inhibición de la ACE debido a la presencia del residuo de prolina en el extremo carbonilo terminal; este mismo comportamiento se ha observado en otros inhibidores naturales de la ACE (Ondetti *et al.*, 1977). Algunos alimentos funcionales que contienen estos péptidos, ya se encuentran en el mercado, y según estudios, se asegura que su consumo constante tiene un efecto en la disminución de la presión arterial, sin embargo, la UE aun no aprueba del todo estos resultados (Mizushima *et al.*, 2004; Tuomilehto *et al.*, 2004; Seppo *et al.*, 2003; Hata *et al.*, 1996). La primera leche fermentada comercial documentada fue Calpis (1919) de origen japonés, fermentada con una combinación de *L. helveticus* CP790 y *Saccharomyces cerevisiae* productores de los tripéptidos VPP e IPP. Por otra parte, Evolus fue la primera leche fermentada comercial europea diseñada para ayudar a disminuir la presión sanguínea, es obtenida por fermentación de la leche con *L. helveticus* LBK16H para producir VPP e IPP. Durante la fermentación de la leche se produce una gran variedad de péptidos derivados de las caseínas (α<sub>1</sub>, α<sub>2</sub> y β), gracias a su contenido en prolina lo que les confiere una alta

flexibilidad y facilita su proteólisis (Otte *et al.*, 2007). La producción de alimentos funcionales con péptidos antihipertensivos derivados de leches fermentadas tendrá un perfil de péptidos acorde a los microorganismos presentes. Por ejemplo, Rojas-Ronquillo *et al.* (2012) reportaron actividad antihipertensiva después de fermentar un medio con caseínas con *L. casei* Shirota y *S. thermophilus*.

### 2.3.2 Péptidos antitrombóticos

El sistema de coagulación, incorpora proteínas procoagulantes y anticoagulantes, el sistema fibrinolítico, plaquetas y el endotelio vascular (O'Shaughnessy *et al.*, 2005). La coagulación produce fibrina por una cascada de reacciones en las que se activan enzimas que a su vez, activan a otras enzimas. La reacción final es la conversión del fibrinógeno, proteína plasmática soluble, a fibrina, proteína insoluble. La conversión de fibrinógeno a fibrina la cataliza la trombina que se forma a partir de su precursor circulante protrombina, por la acción del factor X activado (Ganong, 1996).

Existen varias estrategias para prevenir o evitar la formación de trombos en el torrente sanguíneo: interrupción de la reactividad en plaquetas, inactivación directa de la trombina e inhibición de la producción de trombina (Harker, 1994.). En las leches fermentadas, la actividad antitrombótica se mide por la habilidad que tienen los péptidos antitrombóticos en inhibir la coagulación del fibrinógeno por la trombina (Zhang, *et al.* 2008).

El origen de péptidos antitrombóticos en la leche se debe a la similitud que existe entre dos procesos fisiológicamente importantes de coagulación; el proceso de coagulación de la sangre y de coagulación de la leche (Fiat *et al.*, 1993). La hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína bovina con quimosina es la primera etapa de la coagulación de la leche, en esta reacción la unión entre la F<sub>105</sub>-M<sub>106</sub> de la  $\kappa$ -caseína es hidrolizado dando como resultado la fracción para- $\kappa$ -caseína f(1-105) y el fragmento soluble llamado glicomacropéptido (GMP) del extremo carboxilo terminal f(106-169); de este último fragmento se han obtenido péptidos que actúan sobre el funcionamiento de las plaquetas para inhibir la formación del coágulo (Pihlanto y Korhonen, 2003). Los múltiples péptidos antitrombóticos de la  $\kappa$ -caseína provienen de la secuencia 106 a 116 y de fragmentos pequeños (Meisel, 1997; Jollès *et al.*, 1986). El undecapéptido correspondiente a la fracción 106-116 de la  $\kappa$ -

caseína bovina (Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Gln-Asp-Lys) llamado casoplatelina, es el principal péptido antitrombótico derivado de las proteínas de la leche, el cual es capaz de inhibir la agregación de plaquetas, así como la unión de la cadena  $\alpha$  y del fibrinógeno humano a receptores específicos de la plaqueta. Su actividad se debe a la homología estructural que presenta con el dodecapéptido del extremo carboxilo terminal de la fracción 400-411 de la cadena  $\alpha$  y del fibrinógeno humano (Silva y Malcata, 2005).

Además se ha reportado una similitud entre la cadena  $\alpha$  del fibrinógeno (RGDX 572-575) y la lactoferrina humana (KRDS 39-42), tetrapéptidos que inhiben la agregación de plaquetas (Möller *et al.*, 2008; Erdmann *et al.*, 2008; Rutherford y Gill 2000) y Rojas-Ronquillo *et al.* (2012) reportaron la presencia del péptido antitrombótico YQEPVLPVVRGPFPIIV f(193-209) derivado de la  $\beta$ -caseína, después de la fermentación de caseínas con *L. casei* Shirota.

La actividad antitrombótica no depende del tamaño del péptido, pero si puede influir en el mecanismo de inhibición (Ciprandi *et al.*, 2006). Esto se debe a un rasgo característico de la trombina, contiene dos regiones superficiales electropositivas, llamadas exosito I y II los cuales contribuyen a la especificidad de la trombina, relacionada con el reconocimiento de sustratos inhibidores y receptores (Segers *et al.*, 2007).

#### 2.3.2.1 Efecto antitrombótico de péptidos derivados de la leche

Hasta el momento se han reportado pocas secuencias con actividad antitrombótica *in vitro*, todas derivadas de la  $\kappa$ -caseína: LSFMAIPPK (f(103-111)), MAIPPKK (f(106-112)), MAIPPKKNQDK (f(106-116)), KNQDK (f(112-116)) NQDK (f(113-116)) (Schlimme y Meisel, 1995; Fiat *et al.*, 1993; Fiat y Jollès, 1989; Jollès *et al.*, 1986). Por otra parte, únicamente se han reportado estudios *in vivo* del glicomacropéptido y de los fragmentos 106-116 y 112-116, los cuales fueron probados en un modelo de trombosis arterial provocada por una lesión mínima inducida por laser en conejillo de Indias (Bal dit Sollier *et al.* 1996). La actividad antitrombótica se llevó a cabo con dosis menores que lo reportado de los datos de agregación de plaquetas *in Vitro*. Por otro lado, Chabance *et al.* (1998) y Fosset *et al.* (2002) encontraron los fragmentos activos, 106-116, 105-123, 112-126 y 114-122 de la  $\kappa$ -caseína, en el torrente sanguíneo de humanos y ratas lo que sugiere la

liberación de péptidos durante la hidrólisis gastrointestinal y su transporte a través del epitelio intestinal para llegar al torrente sanguíneo (Thomä-Worringer *et al.*, 2006).

Actualmente en la European Patent 0 397 571 y US Patent 506 3203, 1990 (citado en Phelan y Kerins, 2011) se emplea el GMP para prevenir o tratar la trombosis, la dosis intravenosa recomendada es de 15-30 mg/kg dos veces al día; mientras que para la administración oral una dosis de 50-100 mg/Kg dos veces al día.

## 2.4 Biodisponibilidad de los péptidos

Para que los péptidos sean utilizados como nutracéuticos y ejerzan un efecto fisiológico *in vivo* después de su administración oral, es importante que permanezcan activos durante la digestión y absorción gastrointestinal. Los factores principales que afectan la absorción oral de los péptidos son: la actividad enzimática del mismo y la pobre permeabilidad de los péptidos bioactivos al cruzar las membranas biológicas. Los efectos fisiológicos de los péptidos bioactivos dependen de la capacidad de estos para llegar en una forma activa a los órganos blanco (Lee, 2002). Durante el proceso de digestión, las enzimas proteolíticas gastrointestinales pueden inactivar péptidos o liberarlos de su proteína de origen donde se encontraban inactivos presentando propiedades especiales una vez liberados (Hernández-Ledesma *et al.*, 2010; Vermeirssen *et al.*, 2004).

El proceso de digestión comienza en el estómago con la pepsina a pH ácido (Fig. 4) (Soltero y Ekwuribe, 2005); posteriormente en el lumen del intestino delgado se encuentra la primera barrera de los péptidos ya que contiene una gran cantidad de proteasas pancreáticas como tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina, elastasa y carboxipeptidasa A y B a un pH más alcalino generando una mezcla de oligopéptidos y aminoácidos libres (Arhewoh *et al.*, 2005; Vermeirssen *et al.*, 2004). Los aminoácidos libres son absorbidos en los enterocitos a través de la membrana del borde en cepillo mediante distintos sistemas de transporte de aminoácidos; mientras que los oligopéptidos son sometidos a una hidrólisis adicional por la acción de las peptidasas del borde en cepillo, lo que resulta en una mezcla que consiste principalmente en aminoácidos libres, dipéptidos y tripéptidos (Soltero y Ekwuribe, 2005). Los péptidos formados por dos o tres residuos aminoácidos son absorbidos intactos a través de la membrana del borde en cepillo por un sistema de transporte de péptidos específicos; estos son absorbidos más rápidamente que los

aminoácidos libres y su transporte se favorece (Vermeirssen *et al.*, 2004). Aquellos que resisten el proceso de digestión y llegan intactos al intestino, bien pueden ejercer una función local, ó bien, si su acción es sistémica deben atravesar el epitelio y pasar al torrente circulatorio (Foltz *et al.*, 2007; Fitzgerald y Murray, 2006; Arhewoh *et al.*, 2005; Pihlanto-Leppälä *et al.*, 2000).

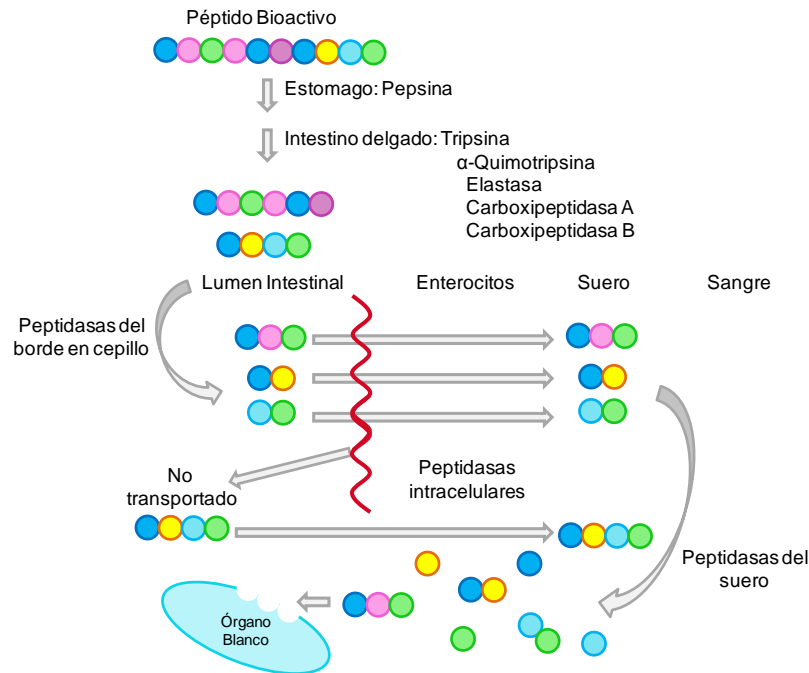


Figura 4. Péptidos en el cuerpo humano durante la digestión gastrointestinal y absorción en la sangre. Adaptado de Vermeirssen *et al.*, 2004.

Estudios sobre la cinética de la digestión de péptidos de leche en animales han demostrado que éstos pueden estar presentes en el organismo, incluso después de la acción de enzimas digestivas, lo que aumenta su disponibilidad para la absorción intestinal (Shimizu, 2004). Maeno *et al.* (1996) reportaron que algunos péptidos inhibidores de la ACE producidos por la fermentación de la leche, pueden ser modificados por la acción de enzimas digestivas, como la carboxipeptidasa A, ya que se demostró que el péptido  $\beta$  169-175, con baja actividad inhibitoria de ACE *in Vitro*, tuvo una reducción significativa en la presión sanguínea después de su ingestión oral al ser administrado en ratas hipertensas. Quirós *et al.* (2009) encontraron que la mezcla de fragmentos VRGPFPIIV, VRGPFPI y GPFPI resultantes de la digestión del péptido VRGPFPIIV f(201-

209) de la  $\beta$ -caseína y VLGPV y LGPVR de la digestión del péptido VLGPVRGPFP f(197-206) de la  $\beta$ -caseína, mantienen la capacidad para inhibir la ACE. Por otro lado, Rojas-Ronquillo *et al.* (2012) estudiaron las propiedades antitrombóticas y antihipertensivas de los péptidos liberados durante la fermentación de caseínas por *L. casei* Shirota, y consiguieron purificar e identificar el péptido multifuncional YQEPVLGPVRGPFPIIV, resistente a la hidrólisis por pepsina y tripsina. Estos resultados indican que las enzimas digestivas juegan un papel importante en la biodisponibilidad de los péptidos; por ello, es indispensable realizar estudios *in vivo* que comprueben el efecto real de los péptidos en el cuerpo humano (Leclerc *et al.*, 2002).

## **3 Objetivos**

### **3.1 Objetivo general**

Purificar péptidos con actividad inhibidora de la ACE y péptidos con actividad antitrombótica presentes en el Sofúl®.

### **3.2 Objetivos particulares**

- Obtener un extracto del Sofúl® libre de gomas.
- Determinar la actividad inhibidora de la ACE y antitrombótica del extracto del Sofúl®.
- Purificar los péptidos con la mayor actividad, tanto inhibidora de la ACE, como antitrombótica.
- Determinar la resistencia de los péptidos purificados a las condiciones de digestión.

## **4 Hipótesis**

Los péptidos derivados del producto comercial fermentado por *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus* (Sofúl) presentan actividad inhibidora de la ACE y/o antitrombótica.

## 5 Justificación

Desde hace varios siglos se reconoce el efecto benéfico del consumo de leches fermentadas. Las cuales poseen propiedades nutritivas, funcionales y biológicas como la disminución de la incidencia de diarreas, la estimulación del sistema inmune, la disminución de la incidencia de cáncer de colon, entre otras. Parte de estos beneficios se derivan de los péptidos que se generan durante la fermentación de la leche, en particular, resulta de gran interés el estudio de aquellas leches que utilizan dos microorganismos, uno de ellos probiótico, ya que cada uno aportará un perfil de péptidos debido a las características propias de cada sistema enzimático. Las leches fermentadas con probióticos, aportan múltiples beneficios a la salud derivados de la colonización del intestino por estos microorganismos. Recientemente, Rojas-Ronquillo *et al.* (2012) aislaron los microorganismos del Soful®, *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*, con el propósito de estudiar la liberación de péptidos bioactivos, inhibidores de ACE y compuestos con actividad antitrombótica; empleando un sistema experimental de fermentación de caseínas de forma independiente. Sus resultados demostraron que cada uno de los microorganismos genera un perfil particular de péptidos.

El Soful® es una leche comercial fermentada con *S. thermophilus* y un probiótico, *L. casei* Shirota. El estudio de este producto comercial nos permitirá conocer la composición de los péptidos bioactivos inhibidores de la ACE y antitrombóticos. En teoría, cada microorganismo debe generar péptidos de acuerdo a las características de su sistema enzimático; se debe señalar que también existe un consumo de los mismos péptidos debido a sus necesidades de metabólicas. Es importante mencionar que la presencia de péptidos bioactivos, representa una ventaja adicional al beneficio que aporta el probiótico directamente.



## 6 Metodología

### 6.1 Obtención del extracto

La preparación del extracto a partir del Sofúl® se hizo con el fin de eliminar el agar, la goma xantana y la grenetina presentes en el producto para analizarlo por HPLC. 10 g de producto fueron mezclados con 12 mL de agua, triton al 1%, tween al 1%, desoxicolato al 1% y acetonitrilo (ACN) al 10 %; posteriormente cada mezcla se centrifugó a 7280 x g a 4 °C por 30 min; y el extracto (sobrenadante obtenido) se filtró a través de 2, 0.8, 0.45 y 0.22 µm y se ultrafiltró en una membrana de 10 kDa para eliminar las gomas presentes en el producto y proteínas mayores en la leche (Millipore, Bedford, Massachusetts, USA). El extracto una vez ultrafiltrado se liofilizó (Freeze dry system, Labconco, Kasas City, MO, USA) y se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso. Entre cada etapa se determinó el contenido de proteína (Lowry *et al.*, 1951), grupos amino libres (Adler-Nissen, 1979) y azúcares totales (Dubois *et al.*, 1956); finalmente al extracto ultrafiltrado se le determinó la capacidad de inhibición de la ACE y de formación de coágulo de trombina.

### 6.2 Determinación del grado de hidrólisis y proteína

El grado de hidrólisis de las proteínas y péptidos fue determinado por la cuantificación de grupos amino libres usando el método del ácido trinitrobenzen-sulfónico (TNBS) (Adler-Nissen, 1979). A 250 µL de muestra se adicionó 2 mL de buffer de fosfatos 0.2125 M y pH 8.2 y 2 mL de TNBS al 0.10% en buffer de fosfatos 0.2125M y pH 8.2, se calentó a 50 °C por una hora en la oscuridad y se adicionó 4 mL de HCl 0.1N para detener la reacción, finalmente se midió la absorbancia a 340 nm.

La proteína fue cuantificada por el método de Lowry *et al.* (1951). A 1 mL de muestra se adicionó 5 mL de reactivo (50 volúmenes de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2% en NaOH 0.1N + 1 volumen de CuSO<sub>4</sub> al 1% en H<sub>2</sub>O + 1 volumen de tartrato de Na y K al 2% en agua), se dejó reposar 10 min en la oscuridad, se adicionó 0.5mL de Fenol Folin Cicocalteu al 50% en agua y se dejó reposar por 30 min en la oscuridad, finalmente se midió la absorbancia a 590 nm.

### 6.3 Determinación de azúcares totales.

Los azúcares totales se determinaron por el método fenol-ácido sulfúrico de Dubois *et al.* (1956). A 1 mL de muestra se adicionó 1 mL de fenol al 5 % en agua y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (96 %), se dejó reposar 10 min y leyó a 490 nm (Shimadzu, UV-160 A, Kyoto, Japan). Se empleó glucosa como estándar.

### 6.4 Determinación de la inhibición de la coagulación del fibrinógeno catalizada por la trombina

Se utilizó el método de Zhang *et al.* (2008) con un control positivo de heparina. Todos los reactivos fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A 140  $\mu\text{L}$  de fibrinógeno al 0.1 % en amortiguador Tris-HCl (0.05 mol/L con 0.12 mM NaCl, pH 7.2) se adicionaron 40  $\mu\text{L}$  de muestra, se incubó 10 min a 37 °C y se absorbió a 405 nm. Posteriormente se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de trombina (12 unidades/mL, resuspendida en el amortiguador Tris-HCl), se incubó 10 min a 37 °C y se leyó a 405 nm. El 100% de actividad se preparó adicionando 40  $\mu\text{L}$  de amortiguador Tris-HCl (que sustituye la muestra) y para el 0% de actividad, se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de amortiguador Tris-HCl (sustituyendo la enzima). La actividad inhibitoria de la formación del coágulo de fibrina fue estimada de acuerdo con Ramchandran y Shah (2008) usando la ecuación 1.

$$\text{Inhibición de la actividad antitrombótica (\%)} = 100 - \left( \frac{A_m - A_0}{A_{100} - A_0} \right) 100 \quad (1)$$

donde:  $A_m$  es la absorbancia de la muestra,  $A_{100}$  es la absorbancia del 100% de actividad y  $A_0$  es la absorbancia del 0 % de actividad.

El grado de eficiencia de inhibición (IER) de la coagulación, se estimó de acuerdo a lo reportado por Chen *et al.* (2007) usando la ecuación 2.

$$\text{IER} = \frac{\text{Inhibición de la actividad antitrombótica (\%)}}{\text{Concentración de péptido} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right)} \quad (2)$$

## 6.5 Determinación de la inhibición de ACE

Se utilizó el método de Fuglsang *et al.* (2002) modificado. Se ajustó el pH de la muestra a 8.3 con NaOH (10 N); a 80  $\mu$ L de muestra se le adicionaron 200  $\mu$ L de amortiguador de sustrato (ácido bórico 0.1 M, NaCl 0.3 M, Hipuril-Histidil-Leucina (HHL) 5 mM, pH 8.3) y 20  $\mu$ L de enzima 0.5 unidades/mL. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C por 60 min y se detuvo adicionando 250  $\mu$ L de HCl 1 N. Se adicionaron 1.7 mL de acetato de etilo para extraer el ácido hipúrico, se agitó en vortex y se centrifugó a 1814xg durante 5 min en una centrifuga SOL-BAT J-600. Se tomaron 800  $\mu$ L de la fase orgánica y se calentó a 95 °C por 30 min para evaporar el acetato de etilo, al residuo se le adicionó 1 mL de agua destilada y se determinó su absorbancia a 230 nm en un Shimadzu, UV-160 A (Kyoto, Japan). El 100 % de actividad se preparó adicionando 80  $\mu$ L de amortiguador libre de sustrato (que sustituye la muestra) y para el 0 % de actividad se adicionaron 20  $\mu$ L de agua desionizada (sustituyendo la enzima). La actividad inhibitoria de la ACE fue estimada de acuerdo con Ramchandran y Shah (2008) usando la ecuación 3 y el grado de eficiencia de inhibición (IER) de la ACE, se estimó de acuerdo a lo reportado por Chen *et al.* (2007) usando la ecuación 4.

$$\text{Inhibición de la actividad de ACE (\%)} = 100 - \left( \frac{A_m - A_0}{A_{100} - A_0} \right) 100 \quad (3)$$

$$\text{IER} = \frac{\text{Inhibición de la actividad de ACE (\%)}}{\text{Concentración de péptido} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right)} \quad (4)$$

## 6.6 Purificación de péptidos

La purificación de los péptidos del extracto del producto lácteo fermentado se realizó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). El extracto del producto se resuspendió en agua acidificada (0.1% TFA) y se fraccionó empleando una columna de exclusión molecular (BIOSEP-SEC-S 2000, 30 mm i.d.x7.8 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA), equilibrando el equipo con una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 6.8 a un

flujo de 1 mL/min. Las fracciones se recolectaron cada minuto después del minuto 12. Las fracciones que presentaron la mayor actividad antihipertensiva y/o antitrombótica fueron analizadas por RP-HPLC, en una columna C18 (Jupiter 5U C<sub>18</sub> column, 25 x 4.6 mm, 300 Å, Phenomenex, Torrance, CA, USA) empleando como fase móvil 0.1% TFA/Agua como solvente A y un 0.1% TFA en ACN/Agua (90:10) como solvente B a temperatura ambiente en un gradiente de B de 30 a 70% con un tiempo de corrida de 40 min y un flujo de 1 mL/min. Las detecciones se realizaron mediante un arreglo de diodos a 215 nm (WATERS 2996 Photo Diode Array Detector, Milford, MA, USA) y temperatura ambiente. Finalmente, se confirmó la pureza de los péptidos bioactivos obtenidos con una corrida isocrática a 1 mL/min con los porcentajes de A y B en los que fue detectado por RP-HPLC para confirmar su pureza.

## 6.7 Digestión enzimática

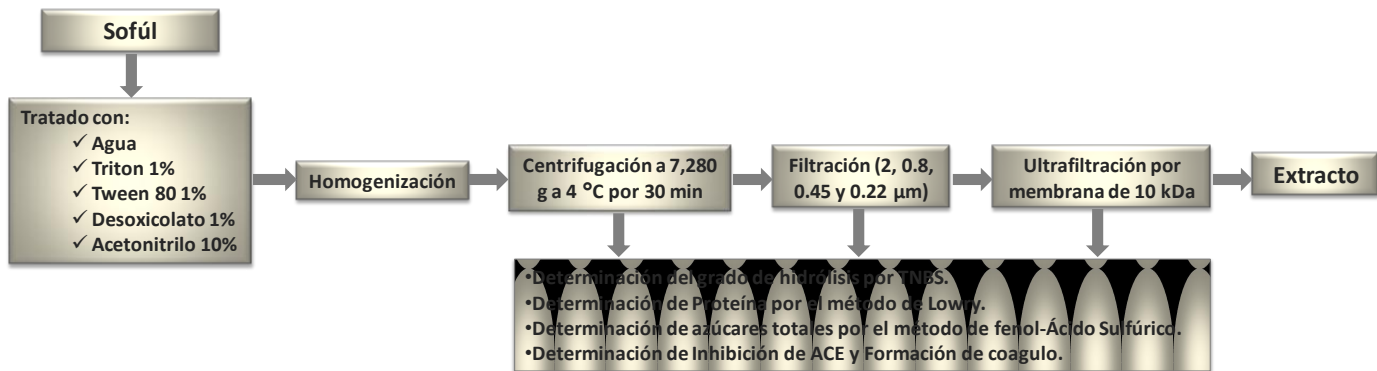
La digestión se realizó para determinar la resistencia de los péptidos bioactivos a la acción de enzimas digestivas. Los péptidos fueron primero hidrolizados con pepsina 1:25 (w/w) (EC 3.4.23.1, 345 unidades/mg) a pH 2.0 y 37 °C durante 90 min agitando a 150 rpm. La reacción se neutralizó al ajustar a pH 7.0 con NaOH 1 N. Una digestión posterior se llevó a cabo durante 240 min a 37 °C con tripsina 1:25 (w/w) (EC 3.4.21.4; 13816 unidades/mg) agitando a 150 rpm. La digestión se detuvo al hervir las muestras durante 10 minutos para inactivar las enzimas. Finalmente las muestras se analizaron por RP-HPLC para determinar el grado de hidrólisis de los péptidos (Ohsawa *et al.*, 2008; Miguel *et al.*, 2006; Quirós *et al.*, 2005).

## 6.8 Análisis estadístico

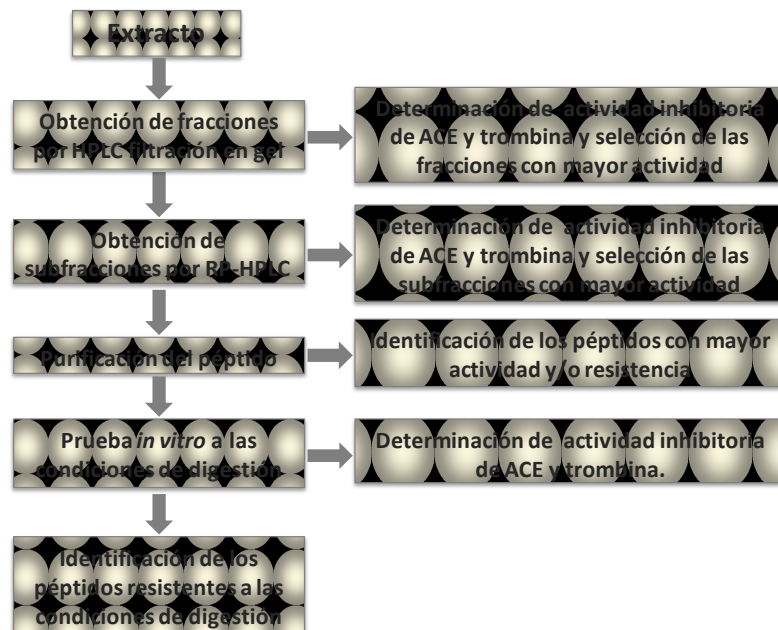
Los resultados fueron analizados por un análisis de varianza de una vía (ANOVA); con un umbral estadístico de significancia de  $p < 0.05$ . Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software para análisis estadístico NCSS 2001 (Kaysville, UT, USA).

## 6.9 Esquema de trabajo

### 6.9.1 Obtención del extracto



### 6.9.2 Análisis del extracto tratado con ACN



## 7 Resultados y discusión

### 7.1 Caracterización del extracto

Se preparó un extracto del producto fermentado con el fin de obtener el máximo de péptidos en solución, libre de la matriz de gel. Para ello, se utilizó urea, Tritón X100, Tween 80, desoxicolato de sodio y acetonitrilo. Al extracto se le determinó el contenido de proteína, de péptidos solubles, así como el grado de hidrólisis por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) y por el método de TNBS (Adler-Nielsen, 1979). Al mismo tiempo se dio seguimiento al contenido de azúcares totales (Dubois *et al.*, 1956) durante las diferentes etapas de purificación.

#### 7.1.1 Determinación de proteína, grupos amino libres y azúcares totales

En la figura 5 se muestra el contenido protéico de cada extracto con los diferentes tratamientos. Se encontró que el extracto con el mayor el contenido protéico fue el desoxicolato (figura 5A). El extracto de ACN fue el segundo en cuanto al contenido protéico, seguido por el de tween 80 y el de agua, sin diferencia significativa entre estos dos últimos. Después de filtrar los extractos (figura 5B), se encontró el mayor contenido protéico en los extractos obtenidos con desoxicolato, ACN y tween 80, sin diferencia significativa entre ellos. Después de la ultrafiltración (figura 5C), el extracto obtenido con desoxicolato presentó el mayor contenido protéico, con diferencia significativa respecto a los valores de los otros extractos. Los extractos ultrafiltrados obtenidos con agua y con ACN fueron los que siguieron en contenidos protéico después del desoxicolato.

La figura 6 muestra el contenido de grupos amino libres presentes en cada tratamiento, el extracto con el mayor contenido de grupos amino libres fue el obtenido con desoxicolato, seguido del de tween 80 y el de ACN, sin diferencias significativas entre ellos (figura 6A). Después de la filtración, el extracto con ACN (6B) presentó significativamente la mayor concentración de grupos amino libres, en comparación con los demás tratamientos. Finalmente, después de la ultrafiltración, el extracto que tuvo significativamente la mayor concentración de grupos amino libres fue el de desoxicolato

(figura 6C), seguido por el de ACN. Cabe señalar que estos valores fueron superiores al contenido de grupos amino libres obtenidos en el sobrenadante de Soful®.

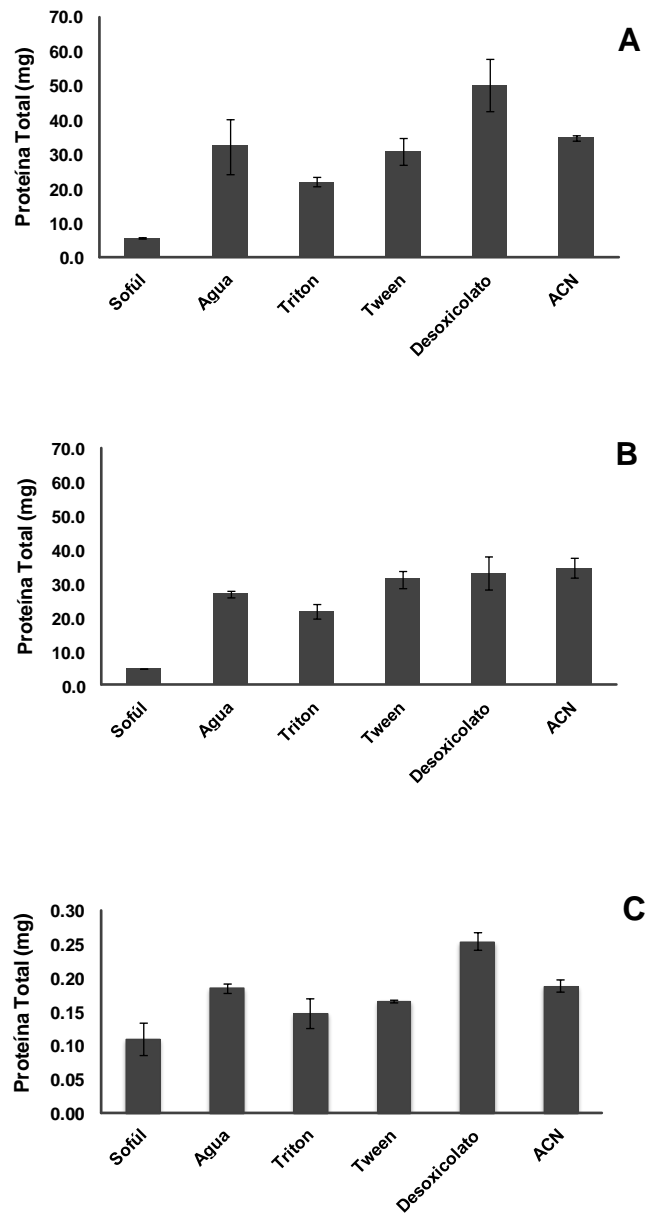


Figura 5. Proteína total del extracto del Soful, con diferentes agentes para la extracción de proteínas: 1% Triton, 1% Tween 80, 1% Desoxicolato y 10% ACN y sobrenadante de Soful®. Donde 5A es el extracto, 5B el extracto filtrado (0.22, 0.45, 0.8 y 2  $\mu$ m) y 5C el extracto ultrafiltrado (10 kDa).

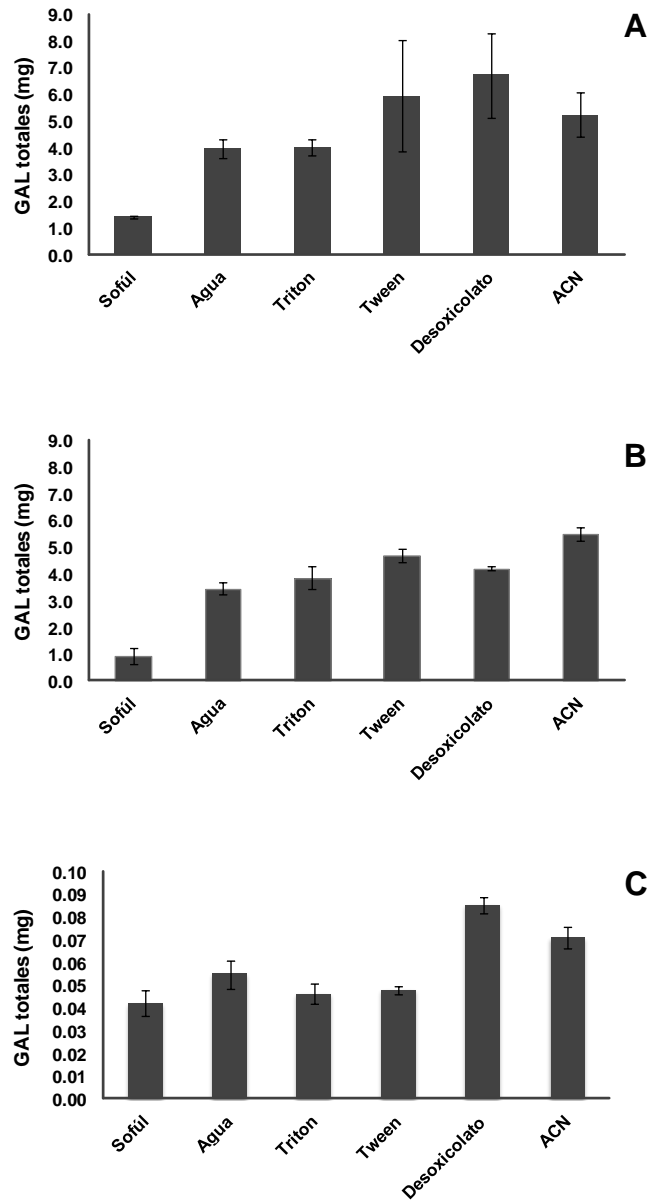


Figura 6. Grupos amino libres totales (GAL) del extracto del Sofúl, con diferentes agentes para la extracción de proteínas: 1% Triton, 1% Tween 80, 1% Desoxicolato y 10% ACN y como testigo Sofúl®. Donde 6A es el extracto, 6B el extracto filtrado (0.22, 0.45, 0.8 y 2  $\mu$ m) y 6C el extracto ultrafiltrado (10 kDa).

La determinación de azúcares nos permitió saber si la filtración y la ultrafiltración ayudaron a la eliminación de las gomas presentes en el producto comercial.



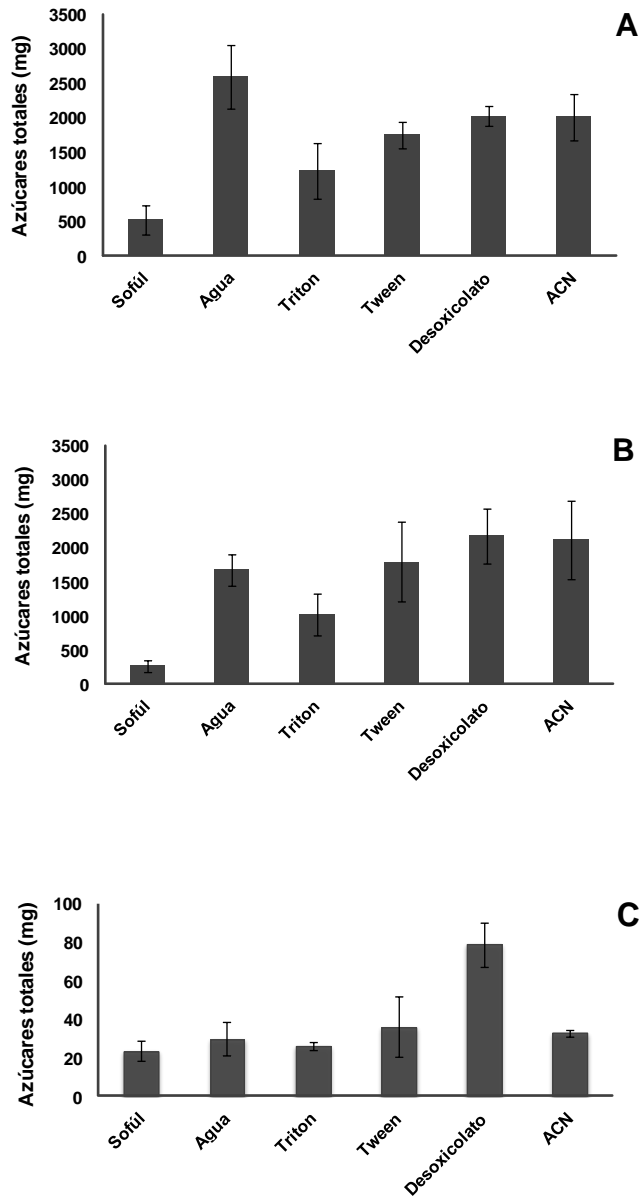


Figura 7. Azúcares totales del extracto del Sofú, con diferentes agentes para la extracción de proteínas: 1% Triton, 1% Tween 80, 1% Desoxicolato y 10% ACN y como testigo Sofú®. Donde 7A es el extracto, 7B el extracto filtrado (0.22, 0.45, 0.8 y 2  $\mu$ m) y 7C el extracto ultrafiltrado (10 kDa).

La figura 7 muestra la cantidad de azúcares totales obtenidos en los diferentes extractos en cada tratamiento. Se observa que la menor concentración de azúcares la presentó el extracto con agua, con tritón, con tween 80, con desoxicolato y con ACN, mientras que la mayor concentración la presentó el agua (figura 7A). Después de la

filtración (figura 7B), se observa una disminución en la concentración de azúcares en el extracto con agua. Finalmente después de la ultrafiltración de las muestras de cada tratamiento (figura 7C), se encontró que los extractos obtenidos con ACN, tween 80, tritón y agua presentaron la menor concentración de azúcar mientras que el extracto con desoxicolato tuvo la mayor concentración. Cabe mencionar que el sobrenadante de Sofúl® ultrafiltrado, presentó una consistencia muy viscosa y de difícil manipulación en comparación con los otros extractos.

Con los resultados obtenidos se demostró que la ultrafiltración nos permitió la eliminar azúcares y proteínas mayores a 10 kDa. El extracto ultrafiltrado que presentó las características adecuadas de mayor contenido de grupos amino libres y menor concentración de azúcares fue el extracto con ACN, con la ventaja de que este compuesto puede ser eliminado fácilmente de la muestra.

#### **7.1.2 Determinación de la actividad inhibitoria de ACE y antitrombótica**

En la figura 8 se muestra la actividad inhibitoria de la ACE y antitrombótica de las muestras durante la ultrafiltración del extracto con ACN. La actividad inhibitoria de la ACE en el extracto con ACN ultrafiltrado, fue de  $41.6 \% \pm 2.4$  y el de la actividad antitrombótica fue superior a 50%. Cabe señalar que el valor de la actividad inhibitoria de la ACE fue superior al obtenido en el sobrenadante del Soful® ( $26.8 \% \pm 5.4$ ). Ambas actividades aumentan en el ultrafiltrado, lo que se traduce en la presencia de péptidos pequeños y con características de solubilidad compatibles con el ACN.

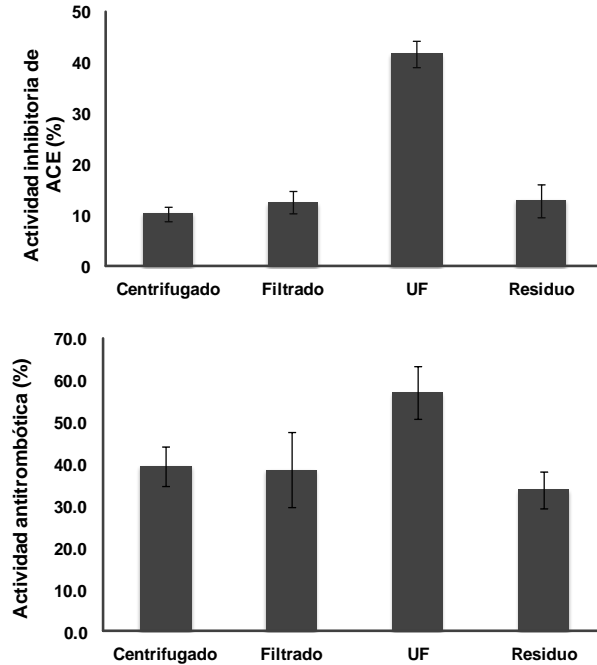


Figura 8. Actividad Inhibitoria de ACE y de la trombina del extracto de Sofúl con ACN durante el tratamiento de centrifugación, filtración (membranas de 2 a 0.2 micras) y ultrafiltración (10 kDa).

Posteriormente, el ultrafiltrado fue separado por HPLC de exclusión molecular a temperatura ambiente a un flujo de 0.5 mL/min (Fig. 9), para asegurar la separación de proteínas mayores a 10 kDa. El empleo de la ultrafiltración es esencial para separar las proteínas mayores de acuerdo con su masa molecular (Jiang, *et al.* 2010; Fitzgerald, *et al.* 2004).

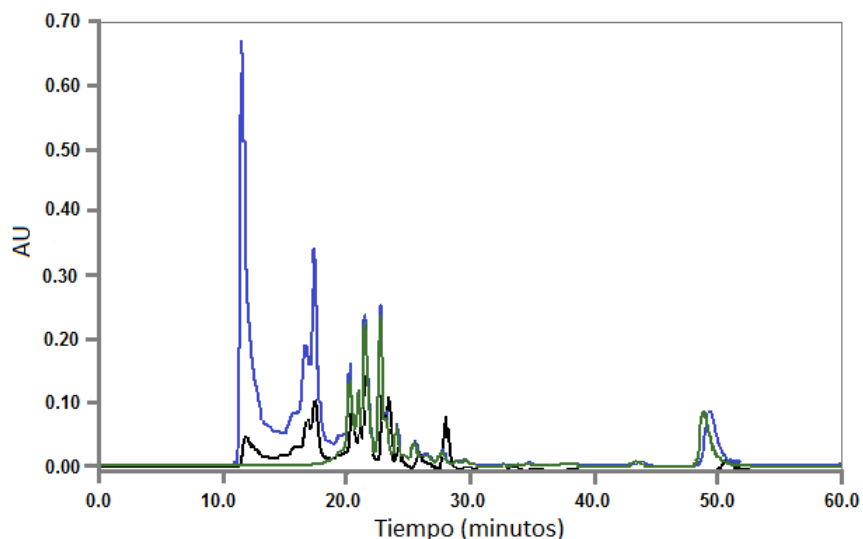


Figura 9. Cromatograma obtenido por filtración en gel (HPLC) del extracto del Sofúl ultrafiltrado. Extracto filtrado (azul), extracto ultrafiltrado (verde) y retenido de la ultrafiltración (negro).

Rojas-Ronquillo *et al.* (2012), aislaron los microorganismos del producto lácteo comercial y realizaron fermentaciones con cada uno, en un medio con caseínas dando como resultado una actividad inhibitoria de la ACE de 20.2 % con *L. casei* Shirota y una inhibición del 10 % con *S. thermophilus*. Estos resultados sugieren un efecto positivo cuando estos microorganismos son cultivados juntos, ya que se produce una mayor proteólisis durante la fermentación de la leche que cuando cada bacteria es utilizada individualmente y probablemente un perfil peptídico diferente lo que se traduce en una mayor actividad inhibitoria de la ACE, como la encontrada en el extracto del producto lácteo fermentado con ambas bacterias (41.6 %  $\pm$  2.4). La actividad antitrombótica en el extracto libre de gomas fue de 57.0 %  $\pm$  16.0, similar a lo reportado por Rojas-Ronquillo *et al.* (2012), quienes reportaron un 50 % de actividad antitrombótica a las 21 h de fermentación con *L. casei* Shirota en medios elaborados con caseínas; por otra parte, no encontraron la actividad en la fermentación de caseínas con *S. thermophilus*. Al comparar éstos resultados con la actividad antitrombótica encontrada en la leche fermentada comercial estudiada aquí, podemos asumir que los péptidos con actividad antitrombótica se debe a la hidrólisis de las caseínas por la actividad proteolítica de *L. casei* Shirota. Existen pocos reportes acerca de péptidos derivados de la leche con actividad antitrombótica y no existen en leches fermentadas (Erdmann *et al.*, 2008). Rojas-Ronquillo *et al.* (2012) mostraron que la hidrólisis de caseínas por *L. casei* Shirota, produce péptidos

inhibidores de la trombina, por lo que la actividad antitrombótica que se encontró en el producto proviene de la actividad proteolítica de *L. casei* Shirota y ésta actividad también fue determinada por la capacidad de inhibición de la formación del coágulo por acción de la trombina. Cabe mencionar que existen otros mecanismos antitrombóticos por péptidos derivados de las proteínas de la leche que han sido reportados; por ejemplo, las casoplatelinas inhiben la agregación de plaquetas activadas por ADP mientras que un péptido encontrado en la  $\kappa$ -caseína une a la cadena  $\gamma$  del fibrinógeno humano a receptores específicos de la superficie de las plaquetas (Schlimme y Meisel, 1995).

## 7.2 Purificación de péptidos

Se decidió trabajar con un lote que tenía diez días previos a su fecha de caducidad debido a que en trabajos previos (Domínguez-González, 2009) se determinó que no existe diferencia significativa en la concentración de proteína, grupos amino libres, perfil de péptidos y actividad inhibitoria de ACE a lo largo del almacenamiento, ni entre lotes. Una vez que se obtuvo el extracto libre de aditivos, fue posible concentrarlo y separar fracciones por cromatografía de filtración en gel (HPLC) a temperatura ambiente a un flujo de 1 mL/min.

En base a los resultados obtenidos del análisis por filtración en gel (HPLC) del proceso de obtención del extracto con ACN (Fig. 9), en donde se observa que a un flujo de 0.5 mL/min después del minuto 20 ya eluyeron las proteínas mayores de la leche (Fig. 10, azul y negro) y ya no hay presencia de proteína en el extracto ultrafiltrado (Fig. 9, verde), se decidió tomar fracciones cada minuto a partir del minuto 12 y finalizando en el minuto 29, dando un total de 17 fracciones.

La masa molecular de las fracciones fue calculada y comparada con los pesos moleculares de los péptidos bioactivos que han sido reportados por otros autores. Al comparar los resultados con otras fuentes (Tabla 2), se encontró que las fracciones 13, 16, 18, 19, 20, 24 y 27 tienen masas moleculares que coinciden con péptidos inhibidores de la ACE. Péptidos con una masa molecular similar a la fracción 14 (PM 5 kDa) han sido reportados como péptidos antimicrobianos, los de la fracción 17 (PM 2.9 kDa) con péptidos con actividad acarreadora de minerales (CPP) y la fracción 18 (2.45 kDa) péptidos inmunomoduladores y CPP; pero ninguno de estos han sido reportados por tener

actividad antitrombótica. Rojas-Ronquillo *et al.* (2012) analizó el producto de la fermentación de caseínas con *L. casei* Shirota y *S. thermophilus* por separado y reportó péptidos con peso molecular por debajo de 6.4 kDa, valor muy similar al encontrado en el presente trabajo.

Cuando se analizó la actividad inhibitoria de ACE de las fracciones obtenidas por cromatografía filtración en gel (Fig. 10), se encontró que la fracción 27 (0.5 kDa), mostró la mayor actividad inhibitoria de ACE ( $78.7 \% \pm 1.5$ ); seguida por la fracción 12 (7.16 kDa) ( $40.8 \% \pm 1.7$ ) y las fracciones 13 (5.9 kDa), 14 (5.0 kDa) y 24 (0.8 kDa) ( $27.3 \% \pm 2.1$ ,  $25.8 \% \pm 2.8$ ,  $28.2 \% \pm 0.7$ ; respectivamente), cuyos valores no tuvieron diferencia significativa entre ellos. Las fracciones 24 y 27 son de interés debido a que los péptidos con la mayor actividad inhibitoria de ACE que han sido reportados son de bajo peso molecular (López-Fandiño *et al.*, 2006; Robert *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2000), ya que su tamaño les ayuda a resistir las condiciones de digestión y posiblemente pueden llegar intactos al torrente sanguíneo (Quiros *et al.*, 2005; Seppo *et al.*, 2003). Por ejemplo, los péptidos VPP e IPP, cuyo valor de  $IC_{50}$  (cantidad necesaria de compuesto para inhibir un 50 % la actividad de la enzima) es de 9 y 5  $\mu M$ , respectivamente (Fuglsang *et al.*, 2003). Sin embargo se ha reportado que los péptidos con masa molecular mayor a 10 kDa también son tan eficaces como los de baja masa molecular (Smacchi y Gobbetti, 2000). Entre otros péptidos que han sido caracterizados se encuentra el péptido RPKHPIKHQ en queso Gouda, que tiene un  $IC_{50}$  de 13.4  $\mu M$ , LVYFPFGPINSLPQ en queso Crescenza con un  $IC_{50}$  de 18  $\mu M$  y NIPPLTQTPV y LVYFPFGPIHNSLPQN con un  $IC_{50}$  de 173 y 71  $\mu M$ , respectivamente, que fueron aislados de leches fermentadas (Pihlanto *et al.*, 2010; Otte *et al.*, 2007; Fitzgerald y Murray, 2006).

Tabla 1. Masa molecular de las fracciones obtenidas por SE-HPLC del extracto de SofúI® y su comparación con los reportados por otros autores.

Tiempo de retención SE-HPLC (min)	Masa molecular calculada (kDa)	Masa molecular reportada (kDa)	Bioactividad reportada	Referencia
12	7.16	7.15	Inhibidor de ACE	Hong <i>et al.</i> 2008
13	5.9	6.1 5.9		Hong <i>et al.</i> 2008 Rojas-Ronquillo <i>et al.</i> 2012
14	5.0	5.5	Antimicrobiano	Silva & Malcata, 2005
16	3.5	3.25 3.5 3.75	Inhibidor de ACE	Hong <i>et al.</i> 2008
17	2.9	2.8 2.7	Inhibidor de ACE CPP	Rojas-Ronquillo <i>et al.</i> 2012 Silva & Malcata, 2005
18	2.45	2.38 2.43 2.54	Inhibidor de ACE Inmunomodulador CPP	Otte <i>et al.</i> 2007 Silva & Malcata, 2005
19	2.05	2.03 2.06 2.16	CPP Inhibidor de ACE Antimicrobiano Inhibidor de ACE	Silva & Malcata, 2005 Pihlanto <i>et al.</i> 2010 Silva & Malcata, 2005 Hernández-Ledesma <i>et al.</i> 2005
20	1.71	2.19 1.74 1.77	Inhibidor de ACE Inhibidor de ACE	Fiat <i>et al.</i> 1993 Fitzgerald & Murray, 2006
24	0.8	0.8	Inhibidor de ACE	Donkor <i>et al.</i> 2007a Fitzgerald & Murray, 2006 Hartmann & Meisel, 2007 Saito, 2008 Silva & Malcata, 2005 Ohsawa <i>et al.</i> , 2008
27	0.5	0.4	Inhibidor de ACE	Otte <i>et al.</i> 2007 Rojas-Ronquillo <i>et al.</i> 2012 Saito, 2008 Silva & Malcata, 2005

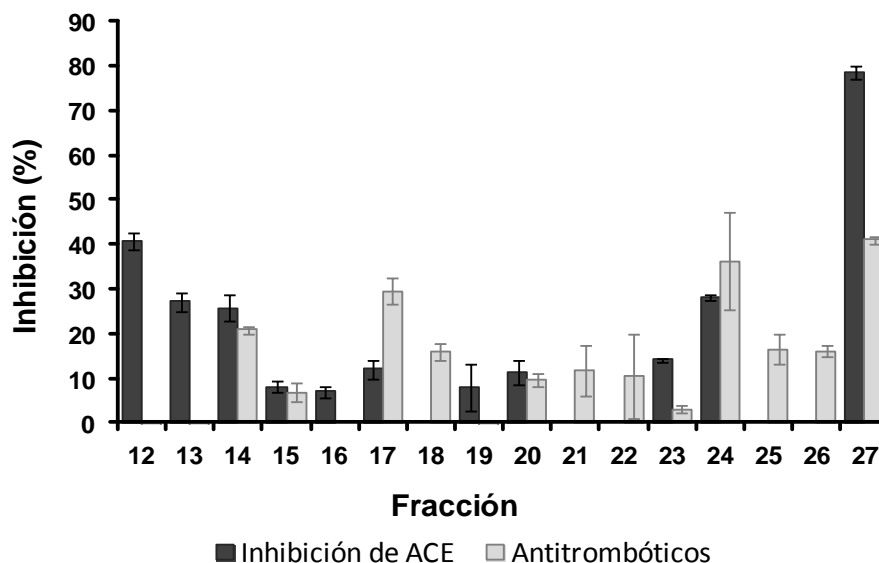


Figura 10. Actividad inhibitoria de ACE y antitrombótica (% Inhibición) de las fracciones del extracto de Sofú obtenidas de la cromatografía de filtración en gel.

Por otra parte, en cuanto a la actividad antitrombótica (Fig. 10), la fracción 27 mostró la mayor actividad ( $41.1 \% \pm 0.9$ ), seguido de las fracciones 24 y 17 ( $36.3 \pm 10.8$  y  $29.5 \pm 3.0$ , respectivamente). Cabe señalar que la actividad antitrombótica no depende del tamaño del péptido, sino de la forma en la que interactúa con la trombina, es decir, el péptido puede interactuar con el sitio activo, con uno de los exositos ó con el sitio activo y uno de los exositos (Baetz y Spinler., 2008; Segers et al., 2007; Ciprandi *et al.*, 2006; Lane *et al.*, 2005; Maraganore *et al.*, 1990). Algunas moléculas inhiben la trombina uniéndose al exosito I, caracterizado por una superficie cargada positivamente localizada en la trombina, esto impide su interacción con el sustrato natural. Por otra parte si los péptidos son largos, pueden interactuar tanto con el sitio activo como con el exosito I, ó sólo puede interactuar con el exosito I quedando el sitio catalítico libre para hidrolizar péptidos pequeños. Por ejemplo, se ha demostrado que la saliva de la garrapata de ganado (*Boophilus microplus*) tiene un inhibidor de la trombina con un peso molecular de 60 kDa y un pequeño inhibidor de la trombina (microphilin) con un peso molecular menor que 3 kDa (Ciprandi *et al.*, 2006). Actualmente, la hirudina y bivalirudina, péptidos sintéticos de 65 y 20 aminoácidos respectivamente, son utilizados como agentes antitrombóticos, que interactúan tanto con el sitio activo como con el exosito I de la trombina (Marder *et al.*, 2004).



Ciprandi *et al* (2006) demostraron que para ejercer la actividad antitrombótica, no solo es importante el tamaño del péptido, también es importante la secuencia de los aminoácidos que componen a cada péptido, la conformación de la molécula y las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (van der Ven *et al.*, 2001).

Se seleccionaron las fracciones con la mayor actividad inhibitoria de ACE y antitrombótica para su análisis por RP-HPLC. Los resultados de la cromatografía en fase reversa muestran que todas las fracciones están compuestas por una gama diversa de péptidos; todos fueron colectados y analizados en cuanto a las bioactividades, para finalmente seleccionar aquellos que presentaron el mayor IER. De la figura 11 a la 15 se muestra el perfil de péptidos encontrados en cada fracción analizada por fase reversa, el mayor número de péptidos se encontró después del minuto 15 en una región más polar. Recordemos que esta característica es importante debido a que la mayoría de los péptidos antihipertensivos reportados son hidrofóbicos por su contenido de prolina y aminoácidos aromáticos, por lo que deben eluir en regiones polares (Ahn *et al.*, 2009; Hartmann y Meisel 2007; Otte *et al.*, 2007; López-Fandiño *et al.*, 2006). Investigaciones previas sobre la relación estructura-actividad de los péptidos inhibidores de la ACE señalan que la región del tripéptido en el extremo carboxilo terminal influye en la unión a la ACE de manera significativa y que los péptidos que contienen residuos de aminoácidos hidrofóbicos en esta región tienen una alta potencia para la inhibición (Pripp *et al.*, 2004; Ondetti y Cushman, 1982; Cheung *et al.*, 1980), además la presencia de aminoácidos con un grupo lateral con carga positiva contribuye significativamente a la potencia inhibitoria de la ACE; aunque el efecto de los grupos laterales cargados positivamente necesita mayor estudio (Fitzgerald y Meisel, 2003). Por otra parte la trombina tiene un aumento en su actividad cuando presenta un residuo de prolina en P2 y/o un residuo de D-fenilalanina en P3 (Bode *et al.*, 1992), los cuales son hidrofóbicos; además sus sustratos favoritos son aquellos que tienen un residuo cargado positivamente en P1 (Huntington, 2005).

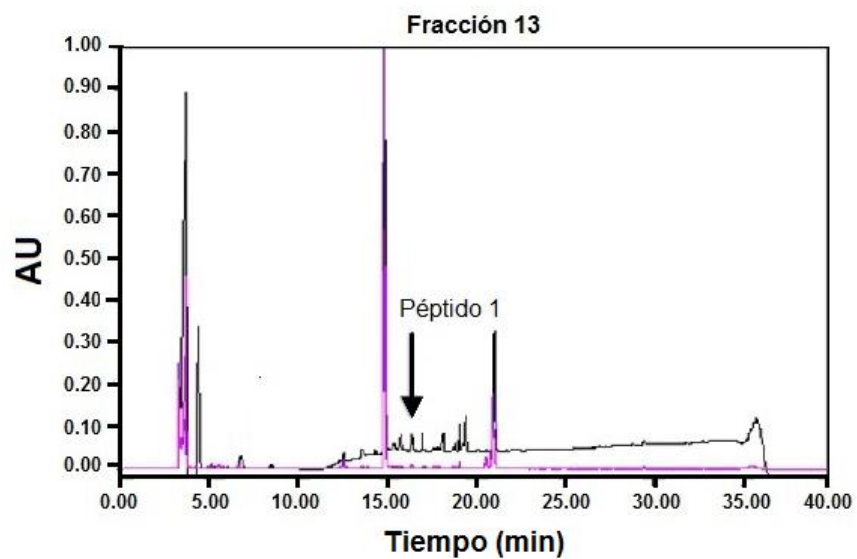


Figura 11. Fracciones recuperadas por RP-HPLC de la fracción 13. Análisis a 215 nm (negro), 257 nm (morado) y 280 nm (rosa). La subfracción señalada presentó la mayor bioactividad.

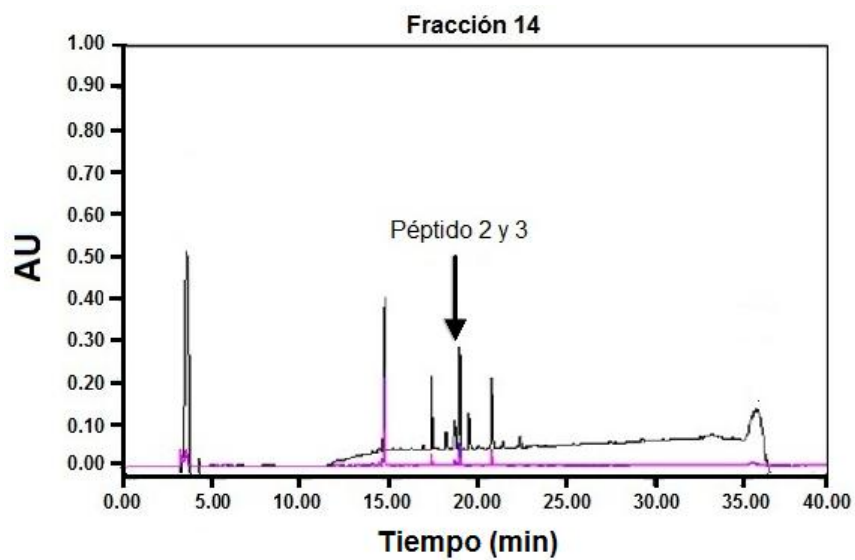


Figura 12. Fracciones obtenidas por RP-HPLC de la fracción 14. Análisis a 215 nm (negro), 257 nm (morado) y 280 nm (rosa). La subfracción señalada presentó la mayor bioactividad.

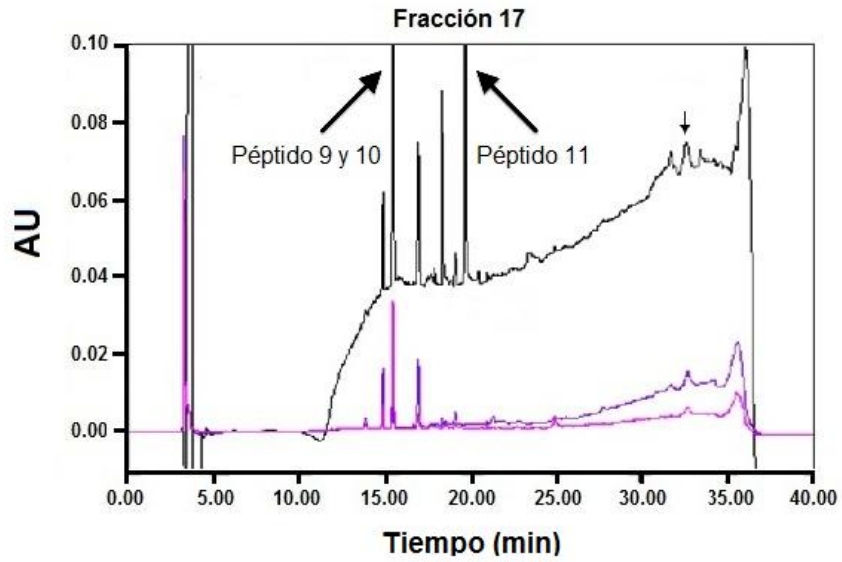


Figura 13. Fracciones obtenidas por RP-HPLC de la fracción 17. Análisis a 215 nm (negro), 257 nm (morado) y 280 nm (rosa). La subfracciones señaladas presentaron la mayor bioactividad.

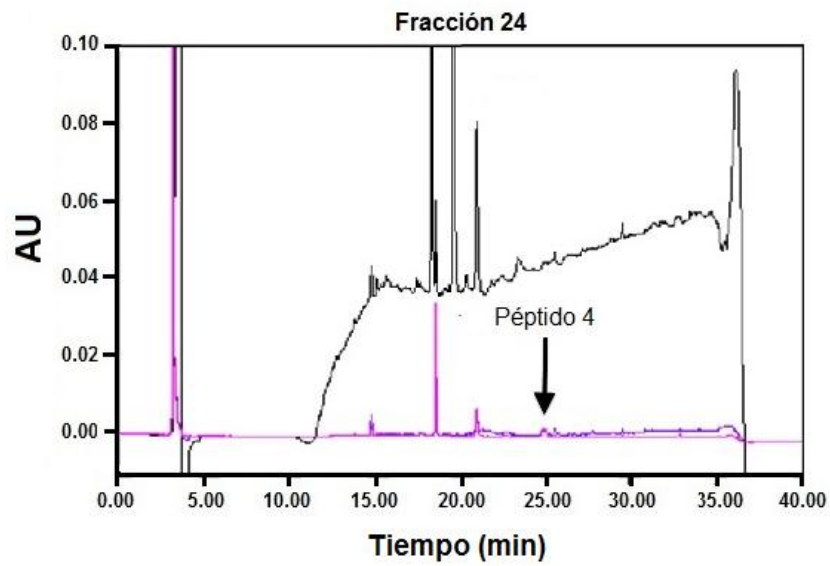


Figura 14. Fracciones obtenidas por RP-HPLC de la fracción 24. Análisis a 215 nm (negro), 257 nm (morado) y 280 nm (rosa). La subfracción señalada presentó la mayor bioactividad.

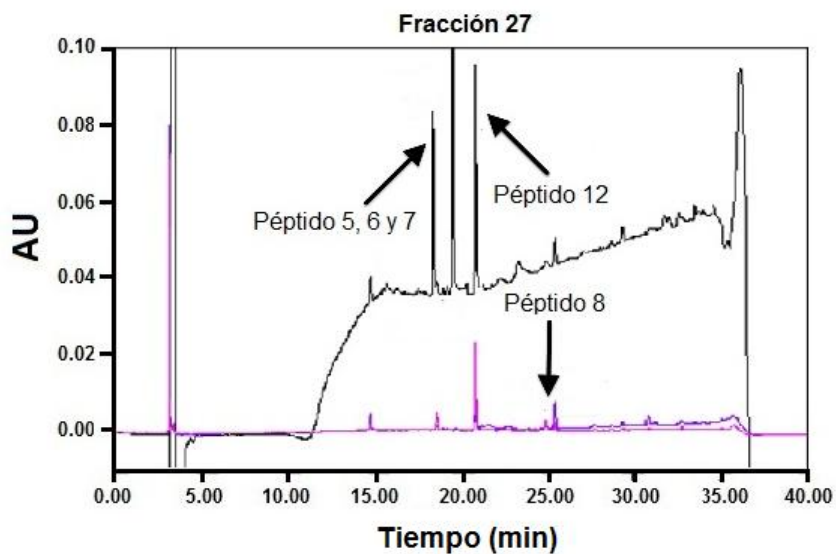


Figura 15. Fracciones obtenidas por RP-HPLC de la fracción 27. Análisis a 215 nm (negro), 257 nm (morado) y 280 nm (rosa). Las subfracciones señaladas presentaron las mayores bioactividades.

Se obtuvieron 39 subfracciones con actividad inhibitoria de ACE; 21 tuvieron valores de IER que oscilaron entre  $7.6 \pm 1.9$  a  $0.5 \pm 0.2$  (Fig. 16); de estas subfracciones se seleccionaron 5 con los valores más elevados: 13,6 ( $7.6 \pm 1.9$ ), 14,4 ( $6.1 \pm 0.5$ ), 24,7 ( $5.9 \pm 0.7$ ), 27, 3 ( $5.8 \pm 1.1$ ) y 27,6 ( $6.8 \pm 0.8$ ). En cuanto a la actividad antitrombótica (Fig. 17), se identificaron 12 subfracciones con valores de IER entre  $18.1 \pm 1.6$  y  $4.9 \pm 1.6$ ; entre las cuales 4 subfracciones mostraron el mayor valor de IER: 17,3 ( $18.1 \pm 1.7$ ), 17,7 ( $17.9 \pm 5.3$ ), 27,3 ( $4.9 \pm 1.6$ ) y 27,5 ( $9.88 \pm 2.8$ ). Es importante destacar que las subfracciones que tuvieron el mayor valor de IER se encuentran en una región más polar (después del minuto 15 de elución), lo que coincide con otros autores que aseguran que los péptidos inhibidores de la ACE son hidrofóbicos por lo que eluyen regiones polares (Ahn *et al.*, 2009; Hartmann y Meisel, 2007; Otte *et al.*, 2007; López-Fandiño *et al.*, 2006). Con estos resultados se asume que los péptidos que se encuentran en las subfracciones seleccionadas, contienen en su estructura aminoácidos hidrofóbicos.

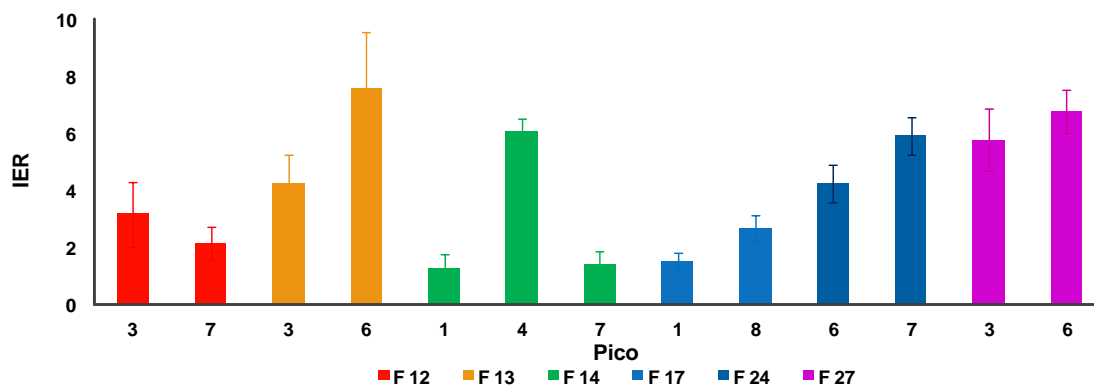


Figura 16. Actividad inhibitoria de la ACE de las subfracciones con mayor IER obtenidas por RP-HPLC de las fracciones 13,14, 17, 24 y 27.

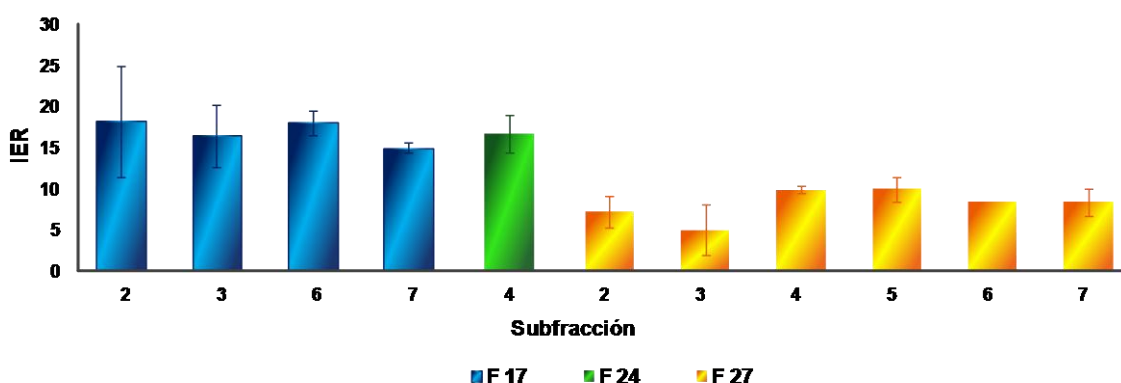


Figura 17. Actividad Antitrombótica de las subfracciones con mayor IER obtenidas por RP-HPLC de las fracciones 17, 24 y 27.

En la tabla 2 se muestran las subfracciones en donde se encontraron los péptidos que presentaron el mayor IER. Los péptidos se analizaron a 215, 257 y 280 nm, debido a que los péptidos inhibidores de la ACE con mayor actividad poseen residuos aminoácidos aromáticos (Phe, Trp y Tyr) (Ahn *et al.*, 2009; Bamdad *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2004; Byun y Kim, 2002; Maruyama *et al.*, 1987; Maruyama y Suzuki, 1982). Se observa que un total de doce péptidos con actividad biológica fueron purificados a partir de las subfracciones, ocho con actividad inhibitoria de la ACE y seis con actividad antitrombótica. Sus valores de IER fueron mayores al probar al péptido purificado en comparación con el valor de la subfracción. También se puede observar que se encontraron dos péptidos

multifuncionales (5 y 6) los cuales provienen de la fracción 27 con una masa molecular aproximada de 0.5 kDa.

Tabla 2. Péptidos bioactivos purificados por RP-HPLC

Tiempo de retención de las fracciones (min)	Subfracciones RP-HPLC	Péptido obtenido por RP-HPLC	Bioactividad	IER*
13	6	1	Inhibidor de ACE	27.3 ± 0.6
14	4	2	Inhibidor de ACE	30.7 ± 0.9
		3	Inhibidor de ACE	29.9 ± 1.8
24	7	4	Inhibidor de ACE	33.8 ± 1.1
27	3	5	Inhibidor de ACE y Antitrombótico	21.3 ± 1.6 y 34.8 ± 14.3
		6	Inhibidor de ACE y Antitrombótico	24.6 ± 0.1 y 59.3 ± 15.2
		7	Inhibidor de ACE	34.2 ± 0.6
		8	Inhibidor de ACE	24.6 ± 1.5
17	3	9	Antitrombótico	83.1 ± 16.7
		10	Antitrombótico	45.4 ± 6.8
27	7	11	Antitrombótico	66.8 ± 9.3
		5	12	Antitrombótico

Por otra parte, en cuanto a la actividad antitrombótica, es importante destacar que hasta el momento solo se han reportado cuatro péptidos procedentes de la  $\kappa$ -caseína de la fracción 106-116 (Meisel, 2005; Clare y Swaisgood, 2000; Jollès *et al.*, 1986). La mayor parte de las investigaciones sobre trombosis están enfocadas en el desarrollo de inhibidores sintéticos y no en la búsqueda de inhibidores naturales en las proteínas (Gresele y Agnelli, 2002). En el presente trabajo se encontraron cuatro posibles secuencias de péptidos, capaces de inhibir a la trombina. Además se encontraron subfracciones multifuncionales con capacidad de inhibir a la ACE y a la trombina, es decir, es posible que los péptidos responsables de la inhibición posean secuencias claves para ejercer este efecto. La mayor parte de los péptidos multifuncionales reportados hasta la fecha poseen actividad inmunomodulatoria o de inhibición de la ACE en combinación con otras bioactividades (Meisel, 2004; Meisel y Fitzgerald, 2003). Actualmente, solamente se han encontrado dos péptidos que poseen las actividades biológicas que se estudian en

este producto; los péptidos correspondientes a las fracciones 152-160 y 155-160 de la *k*-caseína, con actividad inhibidora de la ACE (Mills *et al.*, 2011).

### 7.3 Digestión de péptidos

Se ha mencionado que el tamaño no es un factor limitante para la actividad biológica de los péptidos; sin embargo en el momento de la digestión, el tamaño es muy importante siendo los péptidos de bajo peso molecular los que mejor resisten la hidrólisis enzimática en comparación con péptidos grandes. Esta característica es importante por la relación que existe con lo que sucede durante la digestión *in vivo*, ya que los efectos fisiológicos de los péptidos bioactivos depende de su capacidad para llegar en una forma activa a los órganos blancos. Esto implica la resistencia a las enzimas gastrointestinales (Shimizu, 2004; Vermeirssen *et al.*, 2004) y a las peptidasas de las células de borde de cepillo (Foltz *et al.*, 2007), para poder ser absorbidos intactos a través del epitelio intestinal.

El estudio de la digestión gastrointestinal *in vitro* para la degradación de péptidos permite observar la resistencia de los péptidos en estas condiciones (Quirós *et al.*, 2009; Hernández-Ledesma *et al.*, 2004b; Hernández-Ledesma *et al.*, 2010; Foltz *et al.*, 2007). Algunos péptidos han demostrado ser resistentes a estos procesos fisiológicos, como los lactotripéptidos IPP, VPP y el péptido LHLPLP (Ohsawa *et al.*, 2009; Quirós *et al.*, 2009 y 2008; Foltz *et al.*, 2008).

Las figuras 18, 19 y 20 muestran el perfil de las fracciones sometidas a hidrólisis de los péptidos 2, 5 y 12 respectivamente antes y después de la digestión con pepsina y tripsina; no se encontró diferencia significativa antes y después de la digestión ya que se encuentran intactos y mantienen su actividad. En la tabla 4 y 5 se muestran los péptidos purificados con actividad inhibitoria de la ACE y antirombótica respectivamente, se observa que hubo péptidos que fueron digeridos hasta en tres péptidos más pequeños (péptido 4, 7 y 9) y los cuales presentaron una menor actividad inhibitoria en comparación con el péptido original, péptidos digeridos en dos péptidos con menor actividad (péptido 3, 6 y 8), de los cuales el péptido 6 al ser hidrolizado en uno de los nuevos péptidos conservo la actividad antitrombótica y en el otro la perdió por completo. También se observaron péptidos que solo disminuyeron su actividad inhibitoria (péptido 1, 10 y 11) y

como se mencionó anteriormente, péptidos que conservaron su bioactividad (péptido 2, 5 y 12).

La conservación de la bioactividad está relacionada con la estructura del péptido. Hay secuencias que son resistentes a la hidrólisis enzimática y se sabe que las enzimas digestivas tienen cierta especificidad de corte. Los péptidos purificados fueron sometidos a un proceso de simulación de digestión enzimática empleando pepsina y tripsina y solo tres péptidos resistieron la digestión. Los péptidos 2 y 5 conservaron su actividad inhibitoria de la ACE (Tabla 3), mientras que el péptido 5 y 12 conservaron su actividad antitrombótica (Tabla 4).

Estos péptidos pueden ser considerados en futuros ensayos *in vivo*, con el objetivo de demostrar su capacidad de llegar a sus sitios de acción intactos para ejercer su efecto. Recordemos que deben pasar por una serie de etapas, enfrentarse a las peptidasas del borde en cepillo, ser reconocidos por los transportadores de péptidos intestinales y enfrentarse a las peptidasas del plasma (López-Fandiño *et al.*, 2006). Algunos estudios han demostrado que varios péptidos son resistentes a estos procesos fisiológicos y pueden llegar a la circulación sanguínea, tales como los tripéptidos IPP y VPP (Ohsawa *et al.*, 2008) y péptidos más largos ricos en prolina, como LHLPLP (Quirós *et al.*, 2009).



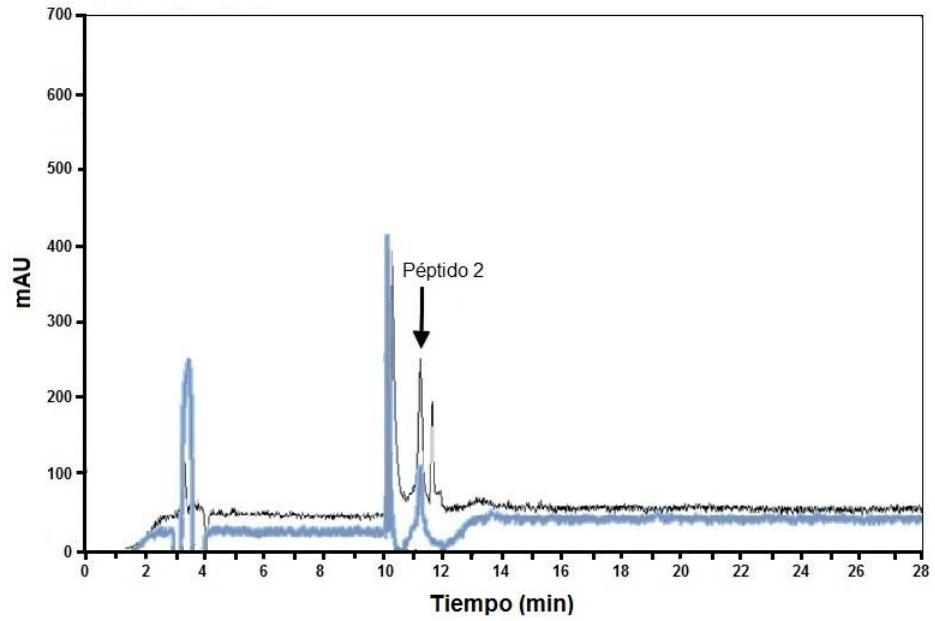


Figura 18. Perfil del péptido 2 antes (negro) y después (azul) de la digestión con pepsina y tripsina. RP-HPLC. 215, 257 y 280 nm.

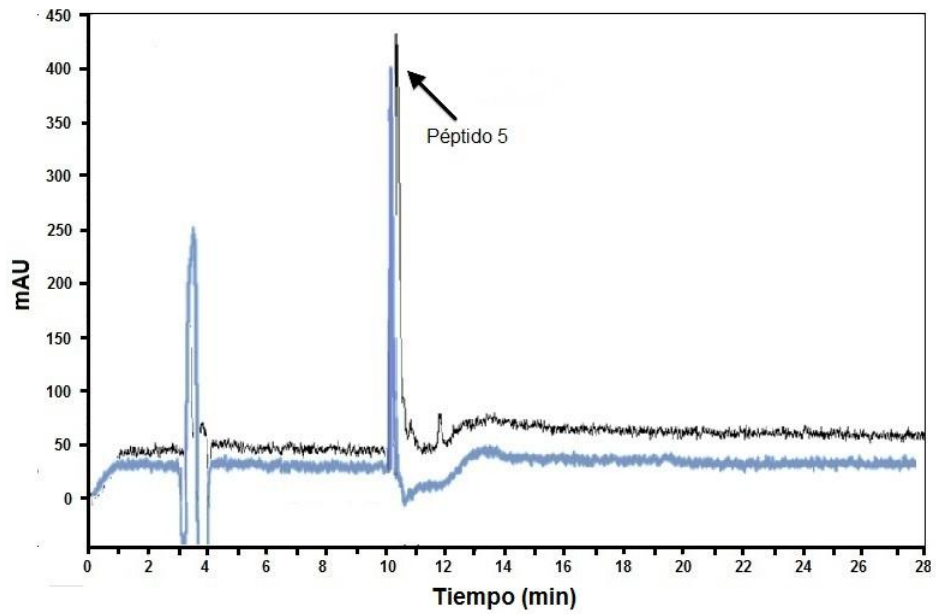


Figura 19. Perfil del péptido 5 antes (negro) y después (azul) de la digestión con pepsina y tripsina. RP-HPLC. 215, 257 y 280 nm.

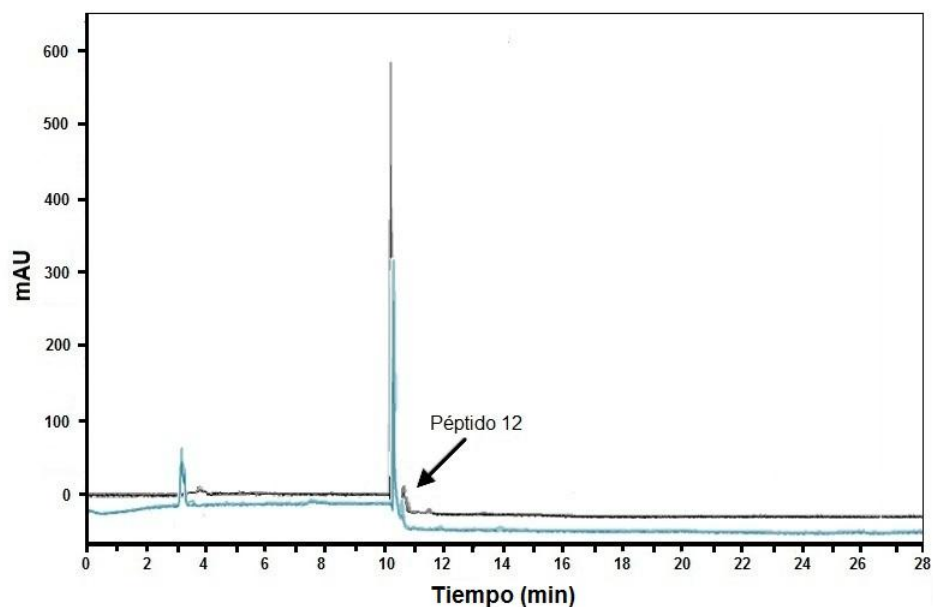


Figura 20. Perfil del péptido 12 antes (negro) y después (azul) de la digestión con pepsina y tripsina. RP-HPLC. 215, 257 y 280 nm.

Tabla 3. Pérdida de la actividad inhibitoria de la ACE (%) de los péptidos, después de la digestión con pepsina y tripsina.

Tiempo de retención de las fracciones de SE-HPLC (min)	Péptido	Disminución de actividad (%)
13	1A	90.5
14	2A	0
	3A	37.8
	3B	79.3
24	4A	81.7
	4B	89.6
	4C	100
27	5A	0
	6A	63.5
	6B	84.2
	7A	82.6
	7B	90.7
	7C	75.7
	8A	68.91
8B	83.2	

Tabla 4. Pérdida de la actividad antitrombótica (%) de los péptidos, después de la digestión con pepsina y tripsina.

Tiempo de retención de las fracciones de SE-HPLC (min)	Péptido	Disminución de actividad (%)
17	9A	89.6
	9B	88.9
	9C	94.1
	10A	94.3
	11A	74.6
27	5A	0
	6A	21.5
	12A	0

Es importante resaltar que ningún péptido probado perdió el 100 % de su actividad, encontrando algunos que retuvieron más del 50 % de la misma; por ejemplo, el péptido 3A el cual se obtuvo de la hidrólisis del péptido 3, retuvo el 62.2 % de la actividad inhibitoria de ACE del péptido original. El péptido 6A retuvo el 78.5 % de su actividad antirombótica y el 36.5 % de su actividad inhibitoria de ACE con respecto al péptido 6. Estos resultados coinciden con lo reportado por Quirós *et al.* (2009), quienes encontraron que la mezcla de los fragmentos VRGPFPIIV, VRGPFPI y GPFPI resultantes de la digestión del péptido VRGPFPIIV ( $\beta$ -caseína f201-209) y los fragmentos VLGPV y LGPVR de la digestión del péptido VLGPVRGPFPI ( $\beta$ -caseína f197-206), conservaban su capacidad para inhibir ACE. Estos experimentos son necesarios antes de realizar experimentos con animales, para revelar la forma activa de la secuencia de residuos aminoácidos al menos en estas condiciones (Gómez *et al.*, 2004).

Además de encontrar péptidos resistentes a la hidrólisis *in vitro* por proteasas digestivas (Tabla 3 y 4), también se encontraron péptidos multifuncionales que comparten la actividad inhibitoria de ACE y antitrombótica, siendo la primer vez que estas propiedades son reportadas en un mismo péptido aislado de una leche fermentada comercial. Gobbetti *et al.* (2004) reportó que las fracciones 152-160 (VIGSPPEIN) Y 155-160 (SPPEIN) obtenidas de la  $\kappa$ -caseína por hidrólisis enzimática poseen tanto actividad inhibitoria de la ACE como antitrombótica. Recientemente Rojas-Ronquillo *et al.* (2012) encontró que el péptido YQEPVLGPVRGPFPIIV de la  $\beta$ -caseína (f193-209) muestra

también ambas actividades, pero en este caso el péptido fue obtenido por fermentación de caseína con *L. casei* Shirota. En este estudio se encontró que la fracción 20 (1.71 kDa) obtenida por cromatografía de filtración en gel (HPLC) tuvo una masa molecular similar al reportado por Rojas-Ronquillo *et al.* (2012) (1.64 kDa) y también demostró tener actividad inhibitoria de la ACE y antitrombótica, sin embargo no fue seleccionada para su posterior análisis debido a que uno de los objetivos de este estudio era la selección de aquellas fracciones con la mayor inhibición de ACE y/o antitrombótica para su purificación.

Los péptidos que resistieron la hidrólisis enzimática son buenos candidatos para ser probados *in vivo*, los péptidos 5 y 6 también merecen especial atención, debido a que estos tienen propiedades multifuncionales, esto significa que tienen más de una actividad (Hartmann y Meisel, 2007). Esto se debe a que muchos péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche se producen en la misma región de la proteína intacta. Estas regiones son consideradas como "zonas estratégicas" en donde los péptidos pueden estar parcialmente protegidos de la degradación proteolítica (Fitzgerald y Murray, 2006; Meisel, 1998). La multifuncionalidad de los distintos péptidos involucra bioactividades muy diferentes: como opioide, acarreadores de minerales, inmunomoduladores, antimicrobianos, antioxidantes, antitrombóticos, hipocolesterolémicos, antihipertensivos y las propiedades se combinan con otras actividades del mismo péptido (Erdmann *et al.*, 2008; Meisel, 2004.). En este caso los péptidos 5 y 6 además de ser péptidos antitrombóticos, mostraron actividad inhibitoria de la ACE con un valor de IER de  $21.3 \pm 1.2$  y  $24.6 \pm 0.1$ , respectivamente. El péptido 6 no resistió la actividad de la pepsina y la tripsina, lo cual se ve reflejado en la pérdida de su actividad inhibitoria de la ACE con un IER de  $24.6 \pm 0.1$  y a la obtención de dos péptidos con valores de IER de  $8.9 \pm 1.2$  y  $3.9 \pm 1.1$ , pero a pesar de ser hidrolizado su actividad antitrombótica fue la misma en uno de los péptidos resultantes ( $46.5 \pm 2.3$ ). Estos resultados demuestran que la secuencia requerida para inhibir a la trombina de una forma directa o indirecta, se encontraba formando parte de la secuencia de un péptido inhibitorio de la ACE, el cual al ser hidrolizado por las enzimas digestivas perdió su actividad pero liberó a la secuencia inhibitoria de la trombina.

El producto lácteo fermentado con *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus* contiene péptidos inhibidores de la ACE y péptidos antitrombóticos, los

cuales se producen durante la fermentación del producto y mantienen su actividad durante la vida útil del mismo. No es posible establecer el potencial de acción en el organismo de los péptidos bioactivos basándonos en las observaciones *in vitro*, ya que no existe una relación directa. Una de las razones se debe a que en un sistema biológico puede haber otros mecanismos de acción diferentes; por ejemplo los inhibidores de la ACE podrían ejercer una relajación directa de los músculos vasculares y/o actividad opioide o antioxidante e incluso actuar en otros sistemas que intervienen en la presión arterial como es el caso del sistema del óxido nítrico. Es por ello que se podría subestimar el potencial del péptido si este es capaz de actuar sobre diferentes mecanismos *in vivo* o sobreestimar su potencial en el caso de que los péptidos sufran degradación o no lleguen al órgano diana. Es probable que precursores no activos que contienen a la secuencia bioactiva puedan entrar al torrente sanguíneo y llegar a sitios potenciales de acción en el cuerpo para obtener efectos después de la liberación proteolítica. Se puede suponer que muchas moléculas de péptidos son degradados y que los efectos biológicos son el resultado de la acción de unos pocos que sobreviven como los productos de digestión (Meisel, 2004). Por lo tanto, es necesario hacer un análisis detallado *in vivo* de estos péptidos para comprobar si son capaces de resistir las condiciones digestivas para llegar a ejercer su efecto para garantizar su actividad biológica.

Hasta ahora, varios estudios han demostrado la eficacia de leches fermentadas que contienen péptidos antihipertensivos en la reducción de la presión arterial en los seres humanos (Boelsma y Kloek, 2009; Mizuno, *et al.* 2005; Seppo, *et al.* 2003; Hata, *et al.* 1996). Sin embargo, los estudios realizados por Lee *et al.* (2007) y Engberik *et al.* (2008) no mostraron tal efecto. Debido a lo anterior hasta ahora no se ha podido concluir la eficacia de un efecto *in vivo* desde un punto de vista estadístico, ya que aún existe la controversia sobre dicho efecto, además del hecho de que no se ha podido asegurar que el efecto se debe específicamente a un péptido o al producto lácteo fermentado, en el que se incluyen una gamma de péptidos con diferentes actividades y diferentes potenciales. En el caso de péptidos antitrombóticos, únicamente se han reportado estudios *in vivo* del glicomacropéptido y de los fragmentos 106-116 y 112-116, los cuales fueron probados en un modelo de trombosis arterial provocada por una lesión mínima inducida por laser en conejillo de Indias realizado por Bal dit Sollier *et al.* (1996), aun no existen reportes de estudios *in vivo* sobre leche fermentada para el control de algún tipo de trombosis, los

estudios se enfocan en el diseño de fármacos como dipéptidos o tripéptidos análogos para que puedan ser fácilmente absorbidos a través de la membrana de las células de borde en cepillo (Zhao, *et al.* 2006). Por lo tanto, es de vital importancia llevar a cabo estudios en animales y humanos que demuestran que los péptidos son capaces de llegar al torrente sanguíneo intactos para ejercer su efecto final. Del presente estudio, son prometedores los péptidos inhibidores de la ACE, 2 y 5, los cuales poseen un porcentaje de inhibición de  $30.7 \pm 0.9$ ,  $21.3 \pm 0.1.6$ , respectivamente, para estudiar su efecto en modelos biológicos. Por otra parte los péptidos antitrombóticos 5 y 12, con inhibiciones de  $34.8 \pm 14.3$  y  $33.8 \pm 10.1$  respectivamente, los cuales podrían ser investigados con detalle.

Muchos microorganismos han sido utilizados para producir péptidos bioactivos en fermentaciones lácteas, especialmente se han utilizado bacterias ácido lácticas en la producción de péptidos inhibidores de la ACE, con *L. helveticus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* y *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, así como las dos especies utilizadas en la producción de yogur tradicional *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (Hernández- Ledesma, *et al.* 2004a; Hernández- Ledesma, *et al.* 2004b; Fuglsang, *et al.* 2003; Seppo, *et al.* 2003; Vermeirssen, *et al.* 2003a y 2003b; Gobbetti, *et al.* 2000). No existen reportes de la fermentación de leche con *L. casei* Shirota y *S. thermophilus* en cultivo mixto en la producción de péptidos inhibidores de la ACE ni en la producción de péptidos antitrombóticos. Esta investigación da pauta para futuras investigaciones en este sentido en el campo de alimentos funcionales. Por otra parte, existe la posibilidad de orientar un estudio hacia la producción de péptidos bioactivos para ser añadidos a otros alimentos o como modelos moleculares para el diseño de una nueva generación de agentes antihipertensivos y antitrombóticos posiblemente sin efectos secundarios lo cual sería de suma importancia ya que la mayoría de los agentes antitrombóticos y antihipertensivos sintéticos los presentan.

## 8 Conclusiones

El producto comercial fermentado con *L. casei* Shirota y *S. thermophilus* (Soful®) presentó actividad inhibidora de la ACE y actividad antitrombótica que se conserva durante la vida de anaquel del producto. De acuerdo a nuestro conocimiento, este es el primer reporte de un producto lácteo comercial con péptidos con actividad antitrombótica.

Se desarrolló una metodología para obtener un extracto libre de gomas que permitió la purificación de los péptidos producidos en la fermentación así como la determinación de sus bioactividades sin interferencias.

Se purificaron 12 péptidos con actividad biológica; ocho péptidos con actividad inhibidora de ACE y seis péptidos con actividad antitrombótica.

Se encontraron dos péptidos multifuncionales, denominados en este trabajo como 5 y 6, que presentaron actividad inhibidora de ACE y antirombótica.

Los péptidos que resistieron la simulación de digestión gástrica fueron los péptidos inhibidores de la ACE, 2 y 5, así como los péptidos con actividad antitrombótica 5 y 12.

El péptido 6 no resistió la simulación de digestión gástrica, sin embargo, los dos péptidos resultantes presentaron menor actividad inhibidora de la ACE y uno de ellos mantuvo su actividad antitrombótica.

Esta investigación establece el potencial de futuras investigaciones *in vivo* en el campo de alimentos funcionales, en particular sobre la actividad de péptidos con actividad inhibidora de la ACE y actividad antitrombótica en beneficio de la salud humana.

## 9 Bibliografía

Adler-Nissen, J.; 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 27(6): 1256-1261.

Agyei, D., Danquah, M.; 2011. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances*. 29(3): 272-277.

Akpemado, K., Bracquart, P.; 1983. Uptake of branched-chain aminoacids by *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 45:136-140.

Ahn, J., Park, S., Atwal, A., Gibbs, B., Lee, 2009. Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides From Whey Fermented By Lactobacillus Species. *Journal of Food Biochemistry*. 33: 587-602.

Arhewoh, I., Ahonkhai, E., Okhamafe, A., 2005. Optimising oral systems for the delivery of therapeutic proteins and peptides, *African Journal of Biotechnology*. . 4(13): 1591-1597.

Axelsson, L.; 1993. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En *Lactic Acid Bacteria* de Salminen, S. y von Wright, A. Edit Dekker. 1-63.

Baetz, B., Spinler, S.; 2008. Dabigatran Etextilate: An Oral Direct Thrombin Inhibitor for Prophylaxis and Treatment of Thromboembolic Diseases. *Pharmacotherapy*. 28(11): 1354-1373.

Bal dit Sollier, C., Drouet, L., Pignaud, G., Chevallier, C., Caen, J., Fiat, A., Izquierdo, C., Jollés, P.; 1996. Effect of k-casein split peptides on platelet aggregation and on thrombus formation in the Guinea-Pig. *Thrombosis Research*. 81(4): 427-437.

Bala, M., Qadar Pasha, M., Bhardwaj, D., Pasha, S.; 2002. Novel peptidomimics as angiotensin-converting enzyme inhibitors: a combinatorial approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 10(11): 3685-3691.



Baldi, A., Politis, I., Chiara, P., Fusi, E., Chronopoulou, R., Dell'Orto, V.; 2005. Biological effects of milk proteins and their peptides with emphasis on those related to the gastrointestinal ecosystem. *Journal of Dairy Research*. 72(special issue): 66-72.

Bamdad, F., Dokhani, S., Keramat, J., Zareie, R.; 2009. The Impact of Germination and In Vitro Digestion on the Formation of Angiotensin Converting Enzyme ( ACE ) Inhibitory Peptides from Lentil Proteins Compared to Whey Proteins. *International Journal of Biological and Life Sciences*. 1(2): 52-62.

Bhuyan, B., Mugesh, G.; 2011. Angiotensin-converting enzyme inhibitors in the treatment of hypertension. *Current Science*. 101(5): 1-7

Bode, W., Turk, D., Karshikov, A.; 1992. The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human  $\alpha$ -thrombin: Structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. *Protein Science*. 1: 426-471

Boelsma, E., Kloek, J.; 2009. Lactotripeptides and antihypertensive effects: a critical review. *British Journal of Nutrition*. 101: 776-786.

Brandelli, A., Bizani, D., Morrissy, A., Dominguez, P.; 2008. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. *International Journal of Food Microbiology*. 121(2): 229–233.

Broadbent, J., McMahon, D., Welker, D., Oberg, C., Moineau, S.; 2003. Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review. *Journal of Dairy Science*. 86(2): 407-423.

Byun, H., Kim, S.; 2002. Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from Alaskan pollack skin. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 35(2): 239–243.

Caplice, E., Fitzgerald, G.; 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 50(1-2): 131-149.

Chabance, B., Marteau, P., Rambaud, J., Migliore-Samour, D., Boynard, M., Perrotin, P., Guillet, R., Jollès, P., Fiat, A.; 1998. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie*. 80(2): 155-165.

Cheison, S., Schmitt, M., Loeb, E., Tetzl, T., Ulrich, K.; 2010. Influence of temperature and degree of hydrolysis on the peptide composition of trypsin hydrolysates of  $\beta$ -lactoglobulin: analysis by LC-ESI-TOF/MS. *Food Chemistry*. 121(2): 457–467.

Chen, G.-W., Tsai, J.-S., Sun Pan, B.; 2007. Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation. *International Dairy Journal*. 17: 641–647.

Cheung, H., Wang, F., Ondetti, M., Sabo, E., Cushman, D.; 1980. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *The Journal of Biological Chemistry*. 255(2): 401-407.

Clare, D; Swaisgood, H.; 2000. Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83: 1187-1195.

Ciprandi, A., Kobe, S., Oliveira, D., Masuda, A., Horn, F., Termignoni, C.; 2006. *Boophilus microplus*: Its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. *Experimental Parasitology*. 114: 40-46.

Courtin, P., Rul, F.; 2004. Interactions between microorganisms in a simple ecosystem : yogurt bacteria as a study model. *Lait*. 84: 125-134.

Crystal, D., Cinq-Mars, C., Chun, H., Kitts D., Li-Chan E.; 2008. Investigation into inhibitor type and mode, simulated gastrointestinal digestion, and cell transport of the angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides in pacific Hake (*Merluccius productus*) fillet hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 410-419.

Davidson, M; Hoover, D.; 1993. Antimicrobial components from Lactic Acid Bacteria. En Lactic Acid Bacteria de Salminen, S. y von Wright, A. Edit Dekker. 127-159.

Dawson, C., Bongard, R., Rickaby, D., Linehan, J., Roerig, D.; 1989. Effect of transit time on metabolism of a pulmonary endothelial enzyme substrate. *The American journal of physiology*. 257: 853–865.

De Vuyst, L., Leroy, F.; 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. 13(4): 194-199.

De Vuyst, L., Tsakalidou, E.; 2008. *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. *International Dairy Journal*. 18: 476–485.

Detmers, F., Lanfermeijer, F., Abele, R., Jack, R., Tampe´, R., Konings, W., Poolman, B.; 2000. Combinatorial peptide libraries reveal the ligand binding mechanism of the oligopeptide binding protein OppA of *Lactococcus lactis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 97(23): 12487–12492.

Doeven, M., Kok, J., Poolman, B.; 2005. Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Molecular Microbiology*. 57(3): 640–649.

Domínguez-González, K.; 2009. Identificación de péptidos con propiedades funcionales en un producto lácteo fermentado (Sofúl). Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, México D. F.

Donkor, O., Henriksson, A., Singh, T., Vasiljevic, T., Shah, N.; 2007a. ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*. 17: 1321-1331.

Donkor, O., Henriksson, A., Vasiljevic, T., Shah, N.; 2007b. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Lait*. 86: 21–38.

Drag, M., Salvensen, G.; 2010. Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nature Reviews*. 6: 690-701

Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F.; 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*. 28(3): 350-356.

Dziuba, M., Darewics, M.; 2007. Food Proteins as Precursors of Bioactive Peptides - Classification Into Families. *Food Science and Technology International*. 13(6): 393-404.

EFSA, 2009, EFSA J., 2009, 1101, pp. 13–15.

EFSA, 2010, EFSA J., 2010; 8, p. 1689.

Elli, M., Callegari, M. L., Ferrari, S., Bessi, E., Cattivelli, D., Soldi, S.; 2006. Survival of yoghurt bacteria in the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 5113–5117.

Erdmann, K., Cheung, B., Schroder, H.; 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 19: 643-654.

Fernandez-Espla, M., Rul, F.; 1999. PepS from *Streptococcus thermophilus*. A new member of the aminopeptidase T family of thermophilic bacteria. *European Journal of Biochemistry*. 263:502–510.

Fernandez-Espla, M., Garault, P., Monnet, V., Rul, F.; 2000. *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(11):4772–4778.

Fiat A., Jollès, P.; 1989. Caseins of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: structural and physiological aspects. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 87(1): 5-30.

Fiat, A., Migliore-Samour, D., Jollès, P.; 1993 Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *Journal of Dairy Science*. 76: 301-310.

Figueroa G I, Cruz G A and Quijano G (2011) The benefits of probiotics in human health. *Journal Microbial Biochemistry and Technology* S1-003 1-6.

Fitzgerald, R ., Meisel, H.; 2003. Capitulo 14 Milk Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides, en *Advanced dairy chemistry: Proteins*. Third edition part B; Kluwer Academic / Plenum Publishers. New York.

FitzGerald, R., Murray, B., Walsh, D., 2004. Hypotensive peptides from milk proteins. *The Journal of Nutrition*. 134(4): 980S-988S.

Fitzgerald, R., Murray, B.; 2006. Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*. 59(2): 118-125.

Foltz, M., Meynen, E., Bianco, V., van Platerink, C., Koning, T., Kloek, J.; 2007. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from a lactotripeptide-enriched milk beverage are absorbed intact into the circulation. *The Journal of Nutrition*. 137(4): 953-958.

Foltz, M., Cerstiaens, A., van Meensel, A., Mols, R., van der Pijl, P., Guus, D., Augustijns, P.; 2008. The angiotensin converting enzyme inhibitory tripeptides Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro show increasing permeabilities with increasing physiological relevance of absorption models. *Peptides*. 29(8): 1312-1320.

Fosset, S., Fromentin, G., Gietzen, D., Dubarry, M., Huneau, J., Antoine, J., Lang, V., Mathieu-Casseron, F., Tomé, D.; 2002. Peptide fragments released from Phe-caseinomacropeptide in vivo in the rat. *Peptides*. 83(10): 1773-1781.

Fuglsang, A., Nilsson, D., Nyborg, N.; 2002. Cardiovascular effects of fermented milk containing angiotensin-converting enzyme inhibitors evaluated in permanently catheterized, spontaneously hypertensive rats. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(7): 3566-3569.

Fuglsang, A., Rattray, F., Nilsson, D., Nyborg, N.; 2003. Lactic acid bacteria: inhibition of angiotensin converting enzyme in vitro and in vivo. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 83: 27-34.

Furie, B., Furie, B.; 2008. Mechanisms of thrombus formation. *The New England Journal of Medicine*. 359(9): 938-949.

Galiani, D., Renné, T., 2007. Intrinsic Pathway of Coagulation and Arterial Thrombosis. *Journal of the American Heart Association*. 27: 2507-2513.

Ganong, W.; 1996. Fisiología médica. 15ª ed; Manual Moderno.

Garault, P., Letort, C., Juillard, V., Monnet, V.; 2000. Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis Is Essential for Optimal Growth of *Streptococcus thermophilus* in Milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(12): 5128–5133.

Garault, P., Le Bars, D., Besset, C., Monnet, V.; 2002. Three Oligopeptide-binding Proteins Are Involved in the Oligopeptide Transport of *Streptococcus thermophilus*. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(1): 32-39.

Gilbert, C., Atlan, D., Blanc, B., Portalier, R., Germond, G., Lapierre, L., Mollet, B.; 1996. A new cell surface proteinase: sequencing and analysis of the prtB gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus. *Journal of Bacteriology*. 178:3059–3065.

Gobbetti, M. 1999. *Lactobacillus casei*. Enciclopedia of Food Microbiology. Institute di Produzione e Preparazione Alimentare, Agriculture Faculty of Foggia, Italy.

Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F., Addeo, F.; 2000. Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. cremoris FT4. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(9): 3898-3904.

Gobbetti, M., Minervini, F., Rizzello, C.; 2004. Angiotensin I- converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*. 57(2-3): 173–188.

Gomes, M., Malcata, F.; 1999. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology*. 10(4-5): 139-157.

Gresele, P., Agnelli, G.; 2002. Novel approaches to the treatment of thrombosis. *Trends in Pharmacological Science*. 23(1): 25-32

Guédon, E., Renault, P., Ehrlich, D., Delorme, C.; 2001. Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptide supply. *Journal of Bacteriology*. 183(12): 3614–3622.

Harker, L.; 1994. New antithrombotic strategies for resistant thrombotic processes. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 34(1):3-16.

Hartmann, R., Meisel, H.; 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 18:163-169.

Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y., Takano, T.; 1996. Placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 64: 767-771.

Hernández-Ledesma, B., Recio, I., Ramos, M. Amigo, L.; 2002. Preparation of ovine and caprine-lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine-lactoglobulin hydrolyzed with thermolysin. *International Dairy Journal*. 12(10): 805–812.

Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., Recio, I.; 2004a. Application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Chromatography A*. 1049: 107-114.

Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., Recio, I.; 2004b. 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-Ledesma, B., Contreras, M., Recio, I.; 2010. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*. 165(1):23-35.

Holck, A., Naes, H.; 1992. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO 151. *Journal of General Microbiology*. 138:1353–1364.

Holzapfel, W., Haberer, P., Geisen, R., Schillinger, U.; 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73(1): 365-373.

Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W., Chi, L.; 2008. The antihypertensive effect of peptides: a novel alternative to drugs?. *Peptides*. 29:1062-1071.

Huntington, J.; 2005. Molecular recognition mechanisms of thrombin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 3(8): 1861-1872.

Iyer, R., Tomar, S., Maheswari, T., Singh, R.; 2010. *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 20: 133–141.

Jauhiainen, T., Wuolle, K., Vapaatalo, H., Kerojoki, O., Nurmela, K., Lowrie, C., Korpela, R.; 2007. Oral absorption, tissue distribution and excretion of a radiolabelled analog of a milk- derived antihypertensive peptide, Ile-Pro-Pro, in rats. *International Dairy Journal*. 17: 1216–1223.

Jay, M.; 2000. Modern food microbiology. 6<sup>th</sup> edition, an Aspen Publication. 113-130.

Jiang, Z., Tian, Bo., Brodcrob, A., Huo, G.; 2010. Production, analysis and in vivo evaluation of novel Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from bovine casein. *Food Chemistry*. 123(3): 779-786.

Jollès, P., Levy-Toledano S., Fiat A., Soria, G., Gillessen, D., Thomaidis, A., Dunn, F., Caen, J.; 1986, Analogy between fibrinogen and casein. Effect of aundecapeptide isolated from  $\kappa$ -casein on platelet function. *European Journal of Biochemistry / FEBS*. 158: 379-382.

Juillard, V., Laan, H., Kunji, E., Jeronimus-Stratingh, C., Bruins, A., Konings, W.; 1995. The extracellular PI-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes  $\beta$ -casein into



more than one hundred different oligopeptides. *Journal of Bacteriology*. 177(12):3472–3478.

Juille, O., Le Bars, D., Juillard, V.; 2005. The specificity of oligopeptide transport by *Streptococcus thermophilus* resembles that of *Lactococcus lactis* and not that of pathogenic streptococci. *Microbiology*. 151: 1987–1994.

Khalid, N., Marth, E.; 1990. Enzymes and Role in Ripening and Spoilage. *Journal of Dairy Science*. 73: 2669-2684.

Kandler, O., Weiss, O.; 1986. Section 14 Regular, nonsporing Gram-positive rods. In Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. Holt (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins. Vol 2: 1208-1234.

Kitts, D., Weiler, K.; 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*. 9(16): 1309-1323.

Klaenhammer, T.; Azcarate-Peril, M., Altermann, E., Barrangou, R.; 2007. Influence of the dairy environment on gene expression and substrate utilization in lactic acid bacteria. *The Journal of Nutrition*. 137:748-750.

Klein, J., Dick, A., Schick, J., Matern, H., Henrich, B., Plapp, R.; 1995. Molecular cloning and DNA sequence analysis of pepL, a leucyl aminopeptidase gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM7290. *European Journal of Biochemistry*. 228(3):570–578.

Knudsen, J., Otte, J., Olsen, K., Skibsted, L.; 2002. Effect of high hydrostatic pressure on the conformation of  $\beta$ -lactoglobulin A as assessed by proteolytic peptide profiling. *International Dairy Journal*. 12:791-803.

Korhonen, H., Pihlanto, A.; 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*. 16: 945-960.

Korhonen, H.; 2009. Bioactive milk proteins and peptides: from science to functional applications. *Journal of Functional Foods*. 1(2): 177-187.

Kunji, E., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., Konings, W.; 1996. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70:187-221.

Lane, D., Philippou, H., Huntington, J.; 2005. Directing thrombin. *Blood*. 106(8): 2605-2612.

Leclerc, P.L., Gauthier, S.F., Bachelard, H., Santure, M., Roy, D., 2002. Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal*. 12(12): 995-1004.

Lee, H.; 2002. Protein drug oral delivery: The recent progress. *Archives of Pharmacal Research*. 25(5): 572-84.

Letort, C., Nardi, M., Garault, P., Monnet, V., Juillard, V.; 2002. Casein utilization by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(6): 3162-3165.

Leroy, F., de Vuyst, L.; 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*. 15: 67-78.

Li, G., Le, G., Shi, Y., Shrestha, S.; 2004. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research*. 24: 469-486.

Lick, S., Drescher, K., Heller, K.; 2001. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in the terminal ileum of fistulated göttingen minipigs. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 4137–4143.

Limsowtin, G.K.Y, M.C. Broome, I.B. Powell. 2002, Lactic acid bacteria, taxonomy. En Roginsky, H., J. W. Fuquay, P. F. Fox (ed.), encyclopedia of dairy sciences. Academic Press. Vol 3: 1470-1478.

López-Fandiño, R., Otte, J., van Camp, J.; 2006. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*. 16: 1277-1293.

Lowry, H., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.

Maeno, M., Yamamoto, N., Takano, T.; 1996. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*. 79:1316-1321.

Marder, V., Rosove, M., Minning, D.; 2004. Foundation and sites of action of antithrombotic agents. *Best Practice & Research Clinical haematology*. 17(1): 3-22.

Maruyama, S., Suzuki, H.; 1982. A Peptide Inhibitor of Angiotensin I Converting Enzyme in the Tryptic Hydrolysate of Casein. *Agricultural and Biological Chemistry*. 46(5): 1393-1394.

Maruyama, S., Mitachi, H., Tanaka, H., Tomizuka, N., Suzuki, H.; 1987. Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from casein. *Agricultural and Biological Chemistry*. 51(6): 1581–1586.

Mazón-Ramos, P., Cordero, A., Quiles, J., Guindo, J.; 2009. Temas de actualidad en hipertensión arterial y diabetes. *Revista Española de Cardiología*. 62(1): 14-27.

Meisel, H.; 1997. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers*. 43(2): 119-128.

Meisel, H., Fitzgerald, R.; 2003. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design*. 9: 1289-1295.

Meisel, H.; 2004. Multifunctional 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.

Merker, M., Audi, S., Brantmeier, B., Nithipatikom, K., Goldman, R., Roerig, D., Dawson, C.; 1999. Proline in vasoactive peptides: consequences for peptide hydrolysis in

the lung. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*. 276: 341-350.

Miguel, M., Muguerza, B., Sánchez, E., Delgado, M., Recio, I., Ramos, M.; 2005. Changes in arterial blood pressure in hypertensive rats caused by long-term intake of milk fermented by *Enterococcus faecalis* CECT 5728. *British Journal of Nutrition*. 94: 36-43.

Miguel, M., Aleixandre, M., Ramos, M., López, R.; 2006. Effect of simulated gastrointestinal digestion on the antihypertensive properties of ACE-inhibitory peptides derived from ovalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 726-731

Miguel, M., Manso, M., López, R., Alonso, M., Salaices, M.; 2007. Vascular effects and antihypertensive properties of  $\kappa$ -casein macropeptide. *International Dairy Journal*. 17(12): 1473–1477.

Miguel, M., Contreras, M., Aleixandre, A., Recio, I.; 2009. ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate. *Food Chemistry* 112(1): 211–214.

Mills, S., Ross, R., Hill, C., Fitzgerald, G., Stanton, C.; 2011. Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. *International Dairy Journal*. 21(6): 377-401.

Mizuno, S., Matsuura, K., Gotou, T., Nishimura, S., Kajimoto, O., Yabune, M., Kajimoto, Y., Yamamoto, N.; 2005. Antihypertensive effect of casein hydrolysate in a placebo-controlled study in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. *British Journal of Nutrition*. 94: 84-91.

Mizushima, S., Ohshige, K., Watanabe, J., Kimura, M., Kadowaki, T., Nakamura, Y., Tochikubo, O., Ueshima, H.; 2004. Randomized controlled trial of sour milk on blood pressure in borderline hypertensive men. *American Journal of Hypertension*, 17: 701–706.

Möller, N., Scholz-Ahrens, K., Roos, N., Schrezenmeir, J.; 2008. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*. 47(4)171-182.

Moreira, M., Abraham, A., De Antoni, G.; 2000. Technological properties of milks fermented with thermophilic lactic acid bacteria at suboptimal temperature. *Journal of Dairy Science* 83:395-400.

Morishita, T.; 1999. Section 4 nutrition and metabolism. En Yakult Central Institute For Microbiological Research (ed.), *Lactobacillus casei* strain Shirota. Yakult Honsha Co. Ltd. pp 38-52.

Muro, C., Álvarez, R., Riera, F., Arana, A., Téllez, A.; 2011. Review: Production and functionality of active peptides from milk. *Food Science and Technology International*. 17(4): 293-317.

Nakazawa, Y., Hosono, A.; 1992. Functions of Fermented Milk-Challenges for the Health Services. Elsevier Appl. Sci., New York, NY.

Nielsen, M., Martinussen, T., Flambard, B., Sorensen, K., 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.

Oberman, H., Libudzisz, Z.; 1998. Fermented Milks in Microbiology of Fermented Foods, Vol. I, 2<sup>nd</sup> edition; Ed. Bryan J. B. Wood. Blackie Academy & Professional; Great Britain.

Ohsawa, K., Satsu, H., Ohki, K., Enjoh, M., Takano, T., Shimizu, M.; 2008. Producibility and digestibility of antihypertensive beta-casein tripeptides, Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro, in the gastrointestinal tract: analyses using an in vitro model of mammalian gastrointestinal digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 854-858.

Ondetti, M., Cushman, D.; 1982. Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annual Review of Biochemistry*. 51: 283-308.

Ondetti, M., Rubin, B., Cushman, D.; 1977. Design of Specific Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme: New Class of Orally Active Antihypertensive Agents. *Science*. 196: 441-444.

O'Shaughnessy, D., Makris, M., Lillicrap, D.; 2005. Practical Hemostasis and Thrombosis. Blackwell Publishing.

Ortiz-Chao, P., Gomez-Ruiz, J., Rastall, R., Mills, D., Cramer, R., Pihlanto, A., Korhonen, H., Jauregi, P.; 2009. Production of novel ACE inhibitory peptides from beta-lactoglobulin using Protease N Amano. *International Dairy Journal*. 19: 69-76.

Otte, A., Germond, J., Chaintreau, A.; 2000. Origin of acetaldehyde during milk fermentation using <sup>13</sup>C-labeled precursors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 1512–1517.

Otte, J., Shalaby, S., Zakora, M., Pripp, A., Elshabrawy, S.; 2007. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: Effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis. *International Dairy Journal*. 17: 488-503.

Pastar, I., Tonic, I., Golic, N., Kojic, M., van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., Topisirovic, L., Jovanovic, G.; 2003. Identification and genetic characterization of a novel proteinase, PrtR, from the human isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(10):5802–5811.

Pavar, M., Hanif, K., Azam, A., Lata, S., Qadar Pasha, M., Pasha, S.; 2006. Structure-activity relationship study between Ornithyl-Proline and Lysyl-Proline based tripeptidomimics as angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 16(8): 2117-2121

Pearce, L., Flint, S.; 2002. *Streptococcus thermophilus*. En Roginsky, H., J. W. Fuquay, P. F. Fox (ed.), Encyclopedia of dairy sciences. Academic Press. Vol 4: 2577-2582.

Pederson, J., Mileski, G., Weimer, B., Steele, J.; 1999. Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Journal of Bacteriology*. 181(15): 4592-4597.

Pelletier, C., Bouley, C., Cayuela, C., Bouttier, S., Bourlioux, P., Bellon-Fontaine, M.; 1997. Cell Surface Characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus*

paracasei subsp. paracasei, and *Lactobacillus rhamnosus* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:1725-1731.

Petranovic, D., Guedon, E., Sperandio, B., Delorme, C., Ehrlich, D., Renault, P.; 2004. Intracellular effectors regulating the activity of the *Lactococcus lactis* CodY pleiotropic transcription regulator. *Molecular Microbiology*. 53(2): 613–621.

Phelan, M., Aherne, A., FitzGerald, R., 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., Kerins, D.; 2011. The potential role of milk-derived peptides in cardiovascular disease. *Food & Function*. 2(3-4):153-167.

Picon, A., García-Casado, M., Nuñez, M.; 2010. Proteolytic activities, peptide utilization and oligopeptide transport systems of wild *Lactococcus lactis* strains. *International Dairy Journal*. 20:156-162.

Pihlanto-Leppala, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T., Korhonen, H.; 2000. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: Concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research*. 67(1):53–64

Pihlanto, A., Korhonen, H.; 2003. Bioactive peptides and proteins. *Advances in Food and Nutrition Research*. 47:175-276.

Pihlanto, A., Virtanen, T., Korhonen, H., 2010. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *International Dairy Journal*. 20: 3-10.

Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L., Recio, I.; 2005. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Peptides Derived from Caprine Kefir. *Journal of Dairy Science*. 88: 3480-3487.

Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M., Migue, I M., Aleixandre, A.; 2007. Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal*. 17:33–41.

Quirós, A., del Mar, M., Ramos, M., Amigo, L., Recio, I.; 2009. Stability to gastrointestinal enzymes and structure–activity relationship of  $\beta$ -casein-peptides with antihypertensive properties. 30: 1848-1853.

Rajagopal, S., Sandine, W.; 1990. Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk. *Journal of Dairy Science*. 73:894-899.

Robert, M., Razaname, A., Mutter, M., Juillerat, M.; 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.

Rojas, R., Cruz, A., Flores, A., Rodriguez, G., Gomez, L., Reyes P., Jimenez, J., Garcia, M.; 2012. Antithrombotic and antihypertensive properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *International Dairy Journal*. **26**:147-154.

Rokka, T., Syvaoja, E., Tuominen, J., Korhonen, H., 1997. Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of *Lactobacillus* GG fermented UHT milk. *Milchwissenschaft*. 52: 675-678.

Rutherford, K., Gill, H.; 2000. Peptide affecting coagulation. *The British Journal of Nutrition*. 84:99-102.

Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh, T.; 2000. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*. 83: 1434-1440.

Saito, T.; 2008. Antihypertensive peptides derived from bovine casein and whey proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 606:295-317.



Salminen, S; Deighton, M; Gorbach, S.; 1993. Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. En Lactic Acid Bacteria de Salminen, S. y von Wright, A. Edit Dekker. 199-225.

Sanz, Y., Lanfermeijer, F., Renault, P., Bolotin, A., Konings, W., Poolman, B.; 2001. Genetic and functional characterization of *dpp* genes encoding a dipeptide transport system in *Lactococcus lactis*. *Archives of Microbiology*.175(5): 334–343.

Sanz, Y., Toldrá, F., Renault, P., Poolman, B.; 2003. Specificity of the second binding protein of the peptide ABC-transporter (Dpp) of *Lactococcus lactis* IL1403. *FEMS Microbiology Letters*. 227(1): 33–38.

Savijoki, K.; 2006. Proteolytic system of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology Biotechnology*, 71: 394-406.

Sawyer, L., Barlowa, P., Bolandc, M., Creamerc, L., Dentona, H., Edwardsc, P., Holte, C., Jamesond, G., Kontopidisa, G, Norrisf, G., Uhr!Inov!lab, S., Wu, S.; 2002. Milk protein structure-what can it tell the dairy industry?. *International Dairy Journal*. 12: 299-310.

Schlimme, E., Meisel, H.; 1995. Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. *Die Nahrung*. 39(1): 1-20.

Segers, K., Dahlbäck, B., Bock, P., Tans, G., Rosing, J., Nicolaes, G.; 2007. The Role of Thrombin Exosites I and II in the Activation of Human Coagulation Factor V *The Journal of Biological Chemistry*. 282(47): 33915-33924.

Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T., Korpela, R., 2003. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 77: 326-330.

Shihata, A., Shah, N.; 2000. Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. 10: 401-408.

Shimizu, M.; 2004. Food derived peptides and intestinal functions. *BioFactors*. 21: 43–47.

Siezen, R.;1999. Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76:139-155

Silva, S., Malcata, X.; 2005. Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*. 15(1):1-15.

Smacchi, E., Gobbetti, M.; 2000. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology*. 17(2): 129-141

Soltero, R., Ekwuribe, N.; 2005. The oral delivery of protein and peptide drugs. In: Drug delivery, principles and applications. 106-110.

Soomro, A., Masud, T., Anwaar, K.; 2002. Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health – A Review. *Pakistan Journal of Nutrition*. 1(1): 20-24.

Sreekumar, O., Hosono, A.; 2000. Immediate effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal flora and fecal enzymes of rats and the in vitro inhibition of *Escherichia coli* in coculture. *Journal of Dairy Science*. 83(5): 931–939.

Stanton, C., Ross, R., Fitzgerald, G., Sinderen, D.; 2005. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*. 16(2): 198-203.

Strobel, H., Russell, J., Driessen, A., Konings, W.; 1989. Transport of Amino Acids in *Lactobacillus casei* by Proton-Motive-Force-Dependent and Non-Proton-Motive-Force-Dependent Mechanisms. *Journal of bacteriology*. 171(1): 280-284.

Svensson, M., Waak, E., Svensson, U., Rådström, P.; 2005. Metabolically Improved Exopolysaccharide Production by *Streptococcus thermophilus* and Its Influence on the Rheological Properties of Fermented Milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(10): 6398-6400.

Takano, T.; 2002. Anti-hypertensive activity of fermented dairy products containing biogenic peptides. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 82: 333-340.

Takahashi, M. 1999. Section 3 morphology and structure. En Yakult Central Institute For Microbiological Research (ed.), *Lactobacillus casei* strain Shirota. Yakult Honsha Co. Ltd. pp 23-30.

Tang, E., Vanhoutte, P.; 2010. Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension?. *European journal of physiology*. 459(6): 995-1004.

Thomá-Worringer, C., Sorensen, J., López-Fandiño, R.; 2006. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *International Dairy Journal*. 16(11): 1324-1333.

Torruco-Uco, J., Dominguez-Magana, M., Davila-Ortiz, G., Martinez-Ayala, A., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D.; 2008. Antihypertensive Peptides an Alternative for Treatment of Natural Origin: A Review. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 6(2): 158-168.

Tsai, J., Chen, T., Pan, B., Gong, S., Chung, M.; 2008. Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk. *Food Chemistry*. 106: 552-558.

Tsakalidou, E., Anastasiou, R., Vandenberghe, I., Beeumen, J., Kalantzopoulos, G.; 1999. Cell-Wall-Bound Proteinase of *Lactobacillus delbriekii* subsp. *lactis* ACA-DC 178: Characterization and Specificity for  $\beta$ -Casein. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(5): 2035-2040.

Tuomilehto, J., Lindstrom, J., Hyyrynen, J., Korpela, R., Karhunen, M., Mikkola, L., Jauhiainen, T., Seppo, L., Nissinen, A.; 2004. Effect of ingesting sour milk fermented using *Lactobacillus helveticus* bacteria producing tripeptides on blood pressure in subjects with milk hypertension. *Journal of Human Hypertension*. 18(11): 795–802.

van der Ven, C., Gruppen, H., de Bont, D., Voragen, A.; 2001. Reversed phase and size exclusion chromatography of milk protein hydrolysates: relation between elution from reversed phase column and apparent molecular weight distribution. *International Dairy Journal*. 11: 83-92.

Vermeirssen, V., Van Camp, J., Verstraete, W.; 2004. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides, *British Journal of Nutrition*. 92: 357–366.

Vinderola, C., Reinheimer, J.; 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*. 36(4): 895–904.

Wood, B., Holzapfel W.; (1995). *The Lactic Acid Bacteria: The genera of lactic acid bacteria*, vol. 2, (pp 235–278). Blackie Academic & Professional, London.

Wu, J., Aluko, R., Nakai, S.; 2006a Structural Requirements of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides: Quantitative Structure-Activity Relationship Study of Di- and Tripeptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(3): 732-738.

Wu, J., Aluko, R., Nakai, S.; 2006b. Structural Requirements of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides: Quantitative Structure-Activity Relationship Modeling of Peptides Containing 4-10 Amino Acid Residues. *QSAR Comb. Sci*. 25(10): 873 – 880.

Yamamoto, N., Ejiri, M., Mizuno, S.; 2003. Biogenic peptides and their potential use. *Current Pharmaceutical Design*. 9(16): 1345-1355.

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

Zhao, M., Bi, L., Bi, W., Wang, C., Yang, Z., Ju, J.; 2006. Synthesis of new class dipeptide analogues with improved permeability and antithrombotic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 14: 4761-4774.

Zirnstain, G., Hutkins, R.; 1977. *Streptococcus thermophilus*. *Science*. 2127-2133.

Zola, P.; 1981. Angiotensin converting enzyme inhibitors, mechanisms of action and clinical implications. Urban & Schwarzenberg Baltimore-Munich