



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Área Académica de Química

Determinación de la capacidad antihipertensiva de fracciones peptídicas derivadas de la fermentación de leche con *Lactobacillus rhamnosus* GG & *Streptococcus thermophilus* 54-102

TESIS

Que para obtener el título de

Química en Alimentos

Presenta

Jessica Lizbeth Sebastian Nicolas

Director

Dr. Luis Guillermo González Olivares

Co-directora

Dra. Judith Jaimez Ordaz

Mineral de la Reforma, Hgo., 2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
 ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

**M. en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO,
 DIRECTOR DE CONTROL ESCOLAR
 DE LA U.A.E.H.,
 Presente:**

Por este conducto le comunico que el jurado asignado a la pasante de la Licenciatura de Química en Alimentos **Jessica Lizbeth Sebastián Nicolás**, quien presenta el trabajo de investigación **"Determinación de la capacidad antihipertensiva de fracciones peptídicas derivadas de la fermentación de la leche con *Lactobacillus rhamnosus* GG & *Streptococcus thermophilus* 54-102"**, después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales, estos han decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

Presidente	Dra. Elizabeth Contreras López	
Primer vocal	Dr. Luis Guillermo González Olivares	
Segundo vocal	Dr. Fidel Pérez Moreno	
Tercer vocal	Dra. Araceli Castañeda Ovando	
Secretario	Dra. Judith Jaimez Ordaz	
Primer suplente	M. en C. Juan Ramírez Godínez	
Segundo suplente	Q.A. Juan Francisco Gutiérrez Rodríguez	

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE
 "Amor, Orden y Progreso"
 Pachuca Hidalgo, 14 de noviembre de 2014.

Dr. Gian Arturo Álvarez Romero
 Coordinador Adjunto de la Licenciatura de
 Química en Alimentos



Área Académica de Química,
 Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5,
 Ciudad del Conocimiento, Colonia Carboneras,
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
 Tel. +52 771 7172000 exts 2200, 2201; Fax 6302
 galv@uaduh.mx

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Leche	2
2.2 Proteínas de la leche.....	2
2.2.1 Caseínas.....	3
2.2.2 Proteínas del suero.....	4
2.3 Bacterias ácido lácticas (BAL)	5
2.3.1 Sistema proteolítico de BAL.....	6
2.4 Leches fermentadas	8
2.5 Hipertensión	10
2.6 Péptidos antihipertensivos.....	12
3 OBJETIVOS.....	14
3.1 Objetivo general	14
3.2 Objetivos específicos.....	14
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
4.1 Propagación de las cepas y preparación del cultivo iniciador	15
4.2 Fermentación	15
4.3 Determinación de la actividad proteolítica por el método de ácido trinitrobencensulfónico (TNBS).....	16
4.4 Análisis de péptidos de bajo peso molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE-Tricina.....	17
4.4.1 Preparación de geles	17
4.4.2 Preparación de muestras y electroforesis	18
4.5 Separación de péptidos con aminoácidos aromáticos por HPLC.....	19
4.6 Determinación de actividad antihipertensiva de péptidos.....	19
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	21
5.1 Cambios de pH durante la fermentación.....	21
5.2 Determinación de grupos amino libres durante la fermentación láctica.....	23
5.3 Separación de péptidos por electroforesis.....	26
5.4 Identificación de aminoácidos aromáticos en fracciones peptídicas.....	29
5.5 Determinación de la actividad antihipertensiva	34
6. CONCLUSIONES	38

7. ANEXOS.....	39
Preparación de medio de cultivo.....	39
Preparación de reactivos para técnica del TNBS.....	39
Preparación de reactivos para electroforesis.....	39
Gel de separación	39
Gel de concentración.....	40
Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%	40
Solución de persulfato de amonio al 10%.....	40
Solución reguladora para la muestra	40
Solución reguladora de corrida Tris-glicina-SDS pH 8.3 (5X)	40
Solución fijadora ácido acético (10%)-metanol (50%).....	40
Solución desteñidora ácido acético (7%)-metanol (10%).....	40
Solución de azul de Coomassie.....	40
Preparación de reactivos para determinación de actividad antihipertensiva	41
8. REFERENCIAS	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacciones catalizadas por la enzima convertidora de angiotensina (ECA).....	11
Figura 2. Reacción de TNBS con los grupos amino libres.....	16
Figura 3. Cambios de pH durante la fermentación de leche por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (A), <i>Streptococcus thermophilus</i> 54-102 (B) y cultivo mixto (c).....	21
Figura 4. Concentración de grupos amino libres durante la fermentación de leche con (A) <i>L. rhamnosus</i> GG, (B) <i>S. thermophilus</i> 54-102 y (C) cultivo mixto.....	24
Figura 5 Separación de péptidos presentes durante la fermentación de leche al 10% con <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (c) CN, (b) BLG y (a) ALA.	26
Figura 6. Separación de péptidos presentes durante la fermentación de leche al 10% con <i>Streptococcus thermophilus</i> 54-102. (c) CN, (b) BLG y (a) ALA.....	27
Figura 7. Separación de péptidos presentes durante la fermentación de leche al 10% con <i>L. rhamnosus</i> GG y <i>Streptococcus thermophilus</i> 54-102. (c) CN, (b) BLG y (a) ALA.....	29
Figura 8. Separación de péptidos producidos por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG por HPLC en columna de exclusión de tamaño a 257 nm (serie 8-I) y 280 nm (serie 8-II). (A) inicio de fermentación, (B) mitad de fermentación y (C) final de la fermentación.	30
Figura 9. Separación de péptidos producidos por <i>S. thermophilus</i> 54-102 por HPLC en columna de exclusión de tamaño a 257 nm (serie 9-I) y 280 nm (serie 9-II). (A) inicio de fermentación, (B) mitad de fermentación y (C) final de fermentación.....	32
Figura 10. Separación de péptidos producidos por <i>L. rhamnosus</i> y <i>S. thermophilus</i> 54-102 por HPLC en columna de exclusión de tamaño, a 257 nm (serie 10-I) y 280 nm (serie 10-II). (A) inicio de fermentación, (B) mitad de fermentación y (C) final de fermentación.....	33
Figura 11. Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina con péptidos liberados por (A) <i>L. rhamnosus</i> GG, (B) <i>S. thermophilus</i> 54-102, (C) cultivo mixto.....	35

Agradecimientos

Agradezco a Dios por todas las bendiciones y a las personas que puso en mi camino, por ser mi fortaleza en momentos de debilidad.

Mamá este logro y éxito también es tuyo, agradezco a Dios por darme una madre como tú... me quieres sin condiciones ni prejuicios, admiras cada paso que doy aunque sea en falso y si resbaló estas ahí, para decir "ánimo, sigue adelante con tus sueños y metas"... te quiero y te admiro mamá.

Existen personas que llegan a nuestra vida para mejorarla y en este caso esa persona me dio una hermana que me alegra cada día de mi vida y le dio a mi madre una esperanza para ser feliz, creo que la palabra gracias no bastará para compensar todo lo que usted hizo Sr. Pedro, su sacrificio y esfuerzo se ve reflejado en este trabajo que posiblemente sin su apoyo no lo hubiera concluido... Mil gracias!!!

Abuelita, cuantos años han pasado desde que vivo contigo... te estoy agradecida por todos aquellos momentos que pasamos juntas, regañándome cuando hacía travesuras o llenándome de consejos para que aprendiera de la vida... gracias por todo ello.

A mis hermanas Dulce y Farahid, que a pesar de ser menores que yo, me han dado grandes lecciones de vida.

A mi sobrinita Faretzi cuyos pasos y pequeños momentos me hacen la Tía más feliz del mundo.

A mis Tías Luisa y Guillermina quienes fueron maestras de la vida, que me enseñaron a esforzarme para conseguir mis metas, también por su apoyo económico y moral en momentos difíciles de mi carrera, a mis Tías Raty, Irma y Lilia, Luis y Jorge y primos Carlitos, Bryan, Nolan, Lupita, Darey, Ángel, Beto, Jesús, Emiliano, Esperanza y Adrián por llenarme de momentos felices, por su apoyo incondicional y por no limitarme a soñar, gracias por aconsejarme y darme motivos para seguir luchando.

Eduardo, agradezco a Dios que te pusiera en mi camino durante todo este tiempo, gracias por todo el apoyo que me brindaste cada día hasta hoy, sé que no habrá manera de agradecer todo eso, gracias por esas sonrisas escurridizas, por el cariño, por las sorpresas y agradezco estos cuatro años de muchas experiencias a tu lado.

Dr. Guillermo, gracias por ser mi tutor de tesis, sé que hubo días de dudas por parte de usted, de que concluyera este trabajo y vea ¡Sí lo terminé!... Gracias por ese regaño, me motivó más a terminar esta tesis, gracias por su apoyo en el laboratorio y sus consejos, no era su obligación y sin embargo, ahí estaba para cada uno de sus alumnos.

Dra. Judith, gracias por haber aceptado ser mi sinodal y gracias por su apoyo y sus consejos durante la carrera, porque a veces parecía que no lo lograría y su empujoncito me sacaba a relucir mi potencial, gracias por todo.

Dra. Eli, gracias por ser mi sinodal y por todo el apoyo que me brindó aun sin conocerme, Dra. Aracely gracias por el apoyo que me brindó durante sus clases y además por asesorarme en el laboratorio. Dr. Fidel, gracias por su apoyo durante los análisis de este trabajo y también por ser parte del comité de evaluadores y finalmente, Maestro Juan, gracias por su carisma que contagia a todos.

A mis amigos que conocí desde el principio de la carrera, y que por distintos motivos nos vimos separados, pero que fueron y seguirán siendo grandes personas: Laurita, Jacqueline y Raola, Elías y Lilitiana.

Al grupo que me adoptó desde cuarto semestre y que a pesar de nuestras diferencias siempre estuvimos apoyándonos. Emmanuel, Isai, Juan Francisco, Fidel, Reyna, Marlenne y Carlos, conocí grandes personas y también hice amigos incondicionales. Estefanía y Olga, compañeras de risas, enojos y lágrimas y aun así, seguimos siendo las mejores amigas.

Gracias Laura, Zaira y Diana quienes me brindan consejos en pláticas a media noche y sonrisas.

Agradezco el apoyo que me brindaron Xóchitl, Zaira, Emmanuel y Juan Francisco en la parte experimental de este trabajo ¡Ustedes hicieron más ameno el tiempo que pasé en el laboratorio!

A la Familia del Rey por haberme apoyado cuando estuve en mis prácticas profesionales, Dra. Yolanda gracias por los consejos y las pláticas, Mar gracias por alegrarme el día con tu risa que contagia. Miau ¡Gracias también por tu apoyo!



Esta investigación fue apoyada por el Programa de Mejoramiento al Profesorado (PROMEP) a través de la convocatoria de apoyo a la incorporación de nuevos PTC (2012), con el número de proyecto 862/1209-1715



Parte de este trabajo se presentó en el 4to Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía llevado a cabo en la ciudad de Zapopan Jalisco en septiembre de 2013

1. INTRODUCCIÓN

La leche es un alimento de alto valor nutricional que durante largo tiempo se ha considerado como un alimento completo debido a sus constituyentes. Estudios recientes han demostrado que este alimento puede ser una fuente rica en compuestos con actividad biológica, principalmente en productos fermentados. Durante distintas investigaciones, se ha observado que la producción de estos compuestos biológicamente activos, se lleva a cabo durante la fermentación con bacterias lácticas, las cuales liberan pequeñas moléculas constituidas por residuos de aminoácidos.

Algunas de estas moléculas proporcionan actividad biológica que puede formar parte de una alternativa como coadyuvantes en el tratamiento de algunas enfermedades, principalmente hipertensión y trombosis. Estas moléculas con actividad biológica reciben el nombre de péptidos bioactivos, están constituidos por una secuencia de aminoácidos, codificados e identificados, los cuales presentan funciones fisiológicas tales como: antimicrobiana, antitrombótica, opioide, inmunoestimuladora y acarreadora de metales o antihipertensiva, siendo esta última la función más estudiada (Baró *et al.*, 2001).

Los péptidos antihipertensivos son capaces de inhibir la acción de la enzima convertidora de angiotensina, reduciendo la formación de angiotensina II y propiciado la degradación de bradiquinina en el ciclo de la renina angiotensina. Debido a esta inhibición se disminuye la vasoconstricción de las arterias y se produce un efecto hipotensor. Estos péptidos con actividad antihipertensiva son de bajo peso molecular (menores a 6 kDa) y se han aislado a partir de hidrolizados enzimáticos de las caseínas, mediante la fermentación con bacterias ácido lácticas y se ha comprobado su liberación durante el proceso de digestión de algunos alimentos. Durante el proceso de fermentación de leche, la capacidad proteolítica de las bacterias ácido lácticas juega un papel muy importante en el fraccionamiento de proteínas a péptidos y aminoácidos libres (Meisel, 1993).

Debido a la importancia de la liberación de péptidos bioactivos en la fermentación láctica, el objetivo de este trabajo fue separar y determinar la capacidad antihipertensiva de fracciones peptídicas liberadas en un proceso de fermentación de leche llevado a cabo por las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Streptococcus thermophilus* 54-102.



2. ANTECEDENTES

2.1 Leche

La leche es una combinación de diferentes estados coloidales la cual es secretada por la glándula mamaria, es muy compleja y está constituida por agua y materia seca disuelta (Baró, *et al.*, 2001). Este complejo coloidal está fisicoquímicamente equilibrado pero es termodinámicamente inestable; está conformado por tres sistemas coloidales: un sistema de dispersión, debido a las sales coloidales que se encuentran unidas a las proteínas; una emulsión debida a la grasa, proteínas y vitaminas que se encuentran en solución y una suspensión debida a las proteínas que se encuentran interaccionando con algunos componentes de la leche (Meisel, 1993).

La leche es un alimento de alto valor nutricional y, al mismo tiempo, es una fuente importante de compuestos con actividades biológicas. Adicionalmente, la leche es considerada como un alimento completo para la alimentación humana y animal. Muchas de sus moléculas bioactivas se producen durante la elaboración de productos derivados, en especial, productos fermentados o madurados usando bacterias lácticas (Fitzgerald y Murray, 2006).

2.2 Proteínas de la leche

La leche contiene una diversidad de proteínas, muchas de las cuales se encuentran en pequeñas cantidades. Las proteínas de la leche pueden clasificarse de acuerdo a sus propiedades físicas y químicas o por sus funciones biológicas. La principal forma de clasificarlas está en función de sus características fisicoquímicas y funcionales. Los dos principales grupos de proteínas presentes en la leche se distinguen por su diferente comportamiento y por su forma de existencia.

Estos dos grupos de proteínas son: las caseínas, que constituyen aproximadamente el 80% de las sustancias proteicas de la leche, y que precipitan a pH de 4.6, que es el punto isoeléctrico y, las proteínas del suero, que son solubles a este mismo pH y que solo precipitan cuando han sido modificadas o desnaturalizadas por tratamientos térmicos (Parra *et al.*, 2000).



2.2.1 Caseínas

Las caseínas son las proteínas predominantes en la leche. Estas proteínas forman polímeros, debido a la gran proporción de grupos ionizables y de polos hidrófobos e hidrófilos que se unen en una misma molécula en una solución coloidal, estas moléculas complejas reciben el nombre de micelas de caseína (Fitzgerald y Murray, 2006).

La micela de caseína es una molécula que está conformada por subgrupos de caseína como la α -caseína (ACN), k-caseína (KCN) y β -caseína (BCN), que se distinguen por una variación genética que esta relacionada con la secuencia de algunos aminoácidos. Estas proteínas contienen grupos hidroxilos esterificados con un grupo fosfato en diferentes posiciones presentes en cada cadena (Baró *et al.*, 2001).

Existen dos vías para la precipitación de la caseína: la vía ácida y la vía enzimática. La primera trata de disminuir el pH inicial de la leche hasta 4.5 en donde se encuentra el punto isoeléctrico de las caseínas, el cual depende de los iones que se encuentran en solución (Leroy y De Vuyst, 2004). La segunda vía utiliza la acción de la quimosina para romper el enlace 105-106 de la KCN y liberar las proteínas hidrofóbicas de la micela de caseína (Walstra y Jenness, 1987).

Se conocen cinco tipos de caseínas:

Caseína α_{s1} . Proteína que presenta la carga más alta y el menor contenido de fosfato después de la caseína kappa. Su cadena polipeptídica está formada por dos regiones predominantemente hidrofóbicas situadas en la posición 1-44 y 90-199 y en los residuos 45-89 de alta polaridad. Todos los grupos fosfato, excepto uno, están en el segmento 45-89 y los residuos de prolina se distribuyen a intervalos en los segmentos hidrofóbicos (Walstra y Jenness, 1987; Walstra *et al.*, 2001; Farrell *et al.*, 2004).

Caseína α_{s2} . Proteína en donde se han encontrado diversas variantes, las cuales difieren en el número de ésteres de fosfato, que oscila entre 10 y 14 por molécula. Las caseínas α_{s2} contienen dos residuos de cisteína en donde se forman puentes disulfuro. Por su alto contenido de fosfato forma enlaces estables con el calcio (Farrell *et al.*, 2004).

Caseína β . Es una proteína hidrofóbica que contiene un gran número de residuos de prolina, su carga está heterogéneamente distribuida, dividiendo la molécula en dos partes que presentan propiedades muy diferentes. Esto provoca que la caseína β tenga propiedades tensoactivas, con una parte hidrofílica cargada y una cola que es una larga



cadena apolar. La asociación de esta proteína también es, de alguna forma, como la de un tensoactivo en cuanto a que se produce una concentración crítica en las micelas. Las micelas están formadas por 20 ó 30 moléculas, cuya asociación es muy dependiente de la temperatura y de la fuerza iónica. A temperaturas inferiores a 5°C no se produce la asociación de la caseína β y la molécula permanece desplegada. En la leche, parte de la caseína se solubiliza a baja temperatura y, en consecuencia, la viscosidad aumenta. Estos cambios son reversibles pero muy lentamente (Walstra *et al.*, 2001)

Caseína γ . Es un producto de la degradación de la caseína β por acción enzimática de la plasmina. Su estructura está formada en mayor proporción con residuos de aminoácidos 29-209 de la secuencia de la caseína β , es decir, con su parte más hidrofóbica (Farrell *et al.*, 2004). La cantidad de caseínas γ puede variar ampliamente dependiendo de la frescura de la leche y de su temperatura de conservación (Walstra y Jenness, 1987).

Caseína κ . Proteína distinta al resto de las caseínas. Sólo contiene dos residuos de cisteína capaces de formar puentes disulfuro intermoleculares, debido a esto, la caseína κ se encuentra en la leche en forma de oligómeros que contienen de 5-11 monómeros. Aproximadamente dos tercios de las moléculas contienen un grupo carbohidratado que está esterificado a una de las treoninas (131, 133, 135 ó 142) y poseen galactosamina, galactosa y uno o dos residuos de ácido N-acetil-neuramínico. Cada uno de estos grupos puede tener una o dos cargas y son bastante hidrofílicos. El enlace peptídico entre los residuos 105 y 106 es rápidamente hidrolizado por la acción de las enzimas; cabe resaltar que hay una región cargada positivamente muy cerca de este enlace. La caseína κ se asocia también fuertemente para formar micelas de más de 30 moléculas, entre las que se incluyen grupos carbohidratados protuberantes (Walstra y Jenness, 1987).

2.2.2 Proteínas del suero

Dentro del suero se pueden encontrar proteínas disueltas conocidas como seroproteínas. Estas proteínas están acompañadas por algunas otras pertenecientes al fraccionamiento de la KCN durante la elaboración de queso. Las proteínas del suero son sensibles a tratamiento térmico provocado por la desnaturalización y agregación molecular. Pueden ser precipitadas por polielectrolitos como la carboximetilcelulosa. De todas las proteínas del suero, las de mayor concentración son la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina (Ryhänen *et al.*, 2001).



α -Lactoalbúmina (ALA). Se encuentra en la leche de vaca en una concentración de 1-1.5 g/L, constituyendo aproximadamente el 3.4% de las proteínas totales y el 20% de las proteínas del lactosuero. Esta proteína, además de tener una función nutricional posee una función bioquímica ya que participa en reacciones enzimáticas, proporcionando a la galactosil-transferasa un incremento en la afinidad por la glucosa, durante la síntesis de lactosa. La ALA, está formada por una cadena de 123 aminoácidos posee dos dominios; uno formado por una α hélice y otro por una pequeña hoja β , estos se unen por un puente de cisteína entre los residuos 73 y 91 que forman el sitio de unión del calcio. Otro puente disulfuro conecta los dos dominios en los residuos 61 y 77 y toda la estructura es estabilizada en cuatro puentes disulfuro, posee un sitio secundario de unión al mismo mineral al que se acoplan cuatro cationes. La unión al calcio produce cambios en la función y estructura terciaria de la proteína, además de este mineral se pueden unir otros cationes como Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^+ y Na^+ . (Ryhänen *et al.*, 2001)

β -lactoglobulina (BLG). Es la proteína más abundante del suero lácteo (50 a 65% del suero y 7 a 12% del total de las proteínas de la leche). Es una proteína globular con una cadena polipeptídica simple de 162 aminoácidos y tiene un peso molecular de alrededor de 18,4 kDa (Kunji *et al.*, 1995). Existen diferentes variantes genéticas de la BLG, entre ellas las más abundantes son la variante A y la B. Estas variantes difieren en la sustitución de una glicina en la variante B por un ácido aspártico en la variante A (Wang *et al.*, 2004). Ambas estructuras están estabilizadas por dos uniones disulfuro (entre Cys 160–Cys 66 y Cys 119–Cys 106) y también contienen un grupo sulfhidrilo libre (Cys 121). A pesar de diferencias menores en la composición de aminoácidos entre las diferentes variantes genéticas, todas poseen un alto contenido de aminoácidos esenciales (Garault *et al.*, 2000). La BLG tiene numerosas funciones biológicas, entre ellas, una alta eficiencia en la unión del retinol (provitamina A). Es una fuente rica en cisteína, un aminoácido esencial que estimula la síntesis de glutatión, el cual es un tripéptido anticarcinogénico que protege contra tumores intestinales. Además, la estructura globular de la BLG la hace muy estable contra las enzimas proteolíticas y los ácidos presentes en el estómago (De Wit *et al.*, 1998).

2.3 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL son un grupo de microorganismos representados por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas, similares (Leroy y De Vuyst, 2004). Pueden ser cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles,



anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes, homofermentativos o heterofermentativos (Fulier, 1989).

El crecimiento de las BAL a diferentes temperaturas y la presencia de enzimas específicas para el desdoblamiento de lactosa y la hidrólisis de caseínas, son factores que definen en gran medida a los diferentes géneros de estas bacterias (Smacchi y Gobbetti, 1998; Fitzgerald y Murray, 2006,).

2.3.1 Sistema proteolítico de BAL

Las BAL poseen un sistema proteolítico eficiente para reducir grandes subunidades de caseínas a oligopéptidos o pequeñas cadenas de aminoácidos y proveer a las células con los aminoácidos necesarios para su crecimiento en la leche (Takahashi, 1999). Este sistema consta de tres pasos principales (Smacchi, y Gobbetti, 2000; Letort y Juillard, 2001;Diaz y Decker, 2003)

1. Proteólisis de la caseína por proteasas ligadas a la pared celular para formar una gran cantidad de péptidos.
2. Transporte de péptidos al interior de las células por un sistemas de transporte de fracciones peptídicas, específico para cada microorganismo.
3. Degradación de péptidos por un diverso grupo de peptidasas hasta formar aminoácidos libres, los cuales son metabolizados o asimilados en proteínas.

2.3.1.1 Proteasas

Las proteasas de las BAL realizan el primer paso en la degradación de la caseína. Las proteasas han sido clasificadas de acuerdo a su actividad y propiedades en: Tipo PI , que actúa sobre la BCN, Tipo PIII, que actúa sobre la ACN, KCN y BCN. y Tipo PI / PIII , que es una mezcla de las anteriores (Fernandez *et al.*,1997).

Estas proteasas son específicas, por lo que han sido utilizadas para la formación de sabores en la elaboración de productos lácteos fermentados. Se encuentran ligadas a la pared celular, degradando la caseína de la leche para formar oligopéptidos, los cuales son transportados a través de las membranas por el sistema de transporte de oligopéptidos (Tjwantan *et al.*, 1993; Juillard *et al.*, 1995).



2.3.1.2 Peptidasas

Una gran variedad de peptidasas (PepA, PepE, PepF, PepO, PepX) tienen la capacidad de degradar a los péptidos generados a partir de la caseína, por la acción de las proteasas. Estos péptidos son degradados a otros más pequeños y algunas veces a aminoácidos libres. Se ha encontrado que las peptidasas, se encuentran dentro de la célula y son altamente específicas (Adda *et al.*, 1982; Dunn y Lindsay, 1985; Lee y Desmazeaud, 1985).

Estas enzimas varían con respecto a sus propiedades bioquímicas y físicas. Muchas de ellas son prolinasas o prolidasas, que hidrolizan los péptidos con residuos de prolina tanto en el extremo C- como el N- terminal (Diaz y Decker, 2003). Las peptidasas son necesarias para liberar la mayor cantidad de aminoácidos necesarios para el desarrollo de los microorganismos (Tjwantan *et al.*, 1993; Kok y De Vos, 1994).

2.3.1.3 Peptidasas específicas de *Streptococcus thermophilus*

La degradación de caseínas por acción de *S. thermophilus* se inicia por una proteinasa extracelular, conocida como PrtS, que se encuentra ligada a su pared celular. Esta enzima tiene diferencias específicas a las proteinasas de pared celular de otras bacterias lácticas. Una de estas diferencias es su punto isoeléctrico, el cual se encuentra a un pH de 4.6 mientras que en otras BAL, el punto isoeléctrico puede estar entre 4.5 y 5 (Chapot-Chartier *et al.*, 1994)

Por otra parte, Shihata y Shah (2000) observaron que algunas especies de *S. thermophilus*, presentaron mayor capacidad para iniciar la primera etapa de la proteólisis (acción de proteinasas). Estos resultados se pueden explicar por sus requerimientos de ácido glutámico y metionina, que son cerca de 5 y 60 veces más, respectivamente, que el contenido de estos mismos aminoácidos libres en la leche (45 y <1 mg/mL, respectivamente) (Juillard *et al.*, 1995). La PrtS se activa cuando en el medio se encuentran concentraciones insuficientes de estos aminoácidos (Letort y Juillard, 2001). De igual manera se ha observado que esta proteinasa es necesaria en los sistemas de cooperación (Somkuti y Paul, 2010).

Courtin y colaboradores (2002) estudiaron los cambios de pH y el desarrollo de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* durante la fermentación de leche. Ellos reportaron que la acción de la proteinasa PrtS fue esencial para el crecimiento de *S. thermophilus* en cultivo



puro, pero no observaron ningún efecto en su crecimiento mientras se encontraba en un cultivo mixto con *L. bulgaricus*. Esto se debió a la presencia de la proteinasa particular PrtB específica del lactobacilo que además es homóloga a la PrtP de lactococo. Por otra parte, la proteinasa PrtB resultó ser esencial para el crecimiento de *S. thermophilus* en cultivos mixtos donde se encontró una disminución de pH mayor que en cultivos puros.

2.3.1.4 Aminopeptidasas

Las aminopeptidasas son enzimas, encontradas en BAL, que hidrolizan péptidos en el extremo N- terminal para generar aminoácidos. Estas enzimas hidrolizan los péptidos en un rango de 2-12 aminoácidos y generalmente presentan baja actividad en dipéptidos con prolina (Diaz y Decker, 2003). Dentro de este grupo de enzimas se encuentran la glutamilaminopeptidasa y la X- prolildipeptidilaminopeptidasa. Estas aminopeptidasas requieren de sustratos específicos e hidrolizan una gran cantidad de dipéptidos, tripéptidos y tetrapéptidos (Tjwantan *et al.*, 1993).

2.4 Leches fermentadas

La fermentación es una forma simple, barata y segura de conservar la leche. El término leche fermentada incluye los productos lácteos obtenidos a partir de una tecnología equivalente a la de la fabricación del yogurt, pero que emplea microorganismos diferentes a *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, los cuales, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-185-SSA1-2002, son los únicos aceptados para la elaboración del yogurt.

Entre los cambios que se producen en la leche durante su fermentación está el descenso del pH que puede llegar hasta un valor de 4. La producción de ácidos no disociados (por ejemplo, ácido láctico), de peróxido y de otras sustancias con actividad antibiótica (bacteriocinas), provoca la inhibición del desarrollo microbiano en leches fermentadas. Debido a que el peróxido sirve como sustrato en algunas enzimas presentes en la leche, hay un potencial de óxido-reducción bajo (Fitzgerald y Murray, 2006).

2.4.1 Generación de péptidos bioactivos en leches fermentadas

Los péptidos bioactivos han sido aislados de diferentes fuentes, tanto animales como vegetales. Estas pequeñas fracciones peptídicas pueden ser liberadas durante la elaboración de productos lácteos fermentados o por acción enzimática. Los cultivos de BAL contienen una gran diversidad de enzimas proteolíticas que son



responsables del rompimiento de las proteínas en péptidos y aminoácidos en la elaboración de leche fermentada (González *et al.*, 2011)

Durante el proceso de fermentación, la proteólisis se lleva a cabo por la acción de proteasas presentes en BAL. Estas enzimas hidrolizan las proteínas durante la fermentación y también durante el almacenamiento (aún en condiciones de refrigeración), de la leche fermentada. Al hidrolizarse las proteínas, muchos oligopéptidos son liberados y estos pueden ser precursores de péptidos con actividades biológicas, cuando son fraccionados por otras enzimas (Korhonen, 2009). Estas pequeñas moléculas derivadas no tienen biodisponibilidad definida debido a que son liberadas de la estructura primaria de las proteínas que se encuentran encriptadas (Ryhänen *et al.*, 2001).

La actividad biológica de los péptidos bioactivos depende en gran parte de los aminoácidos que lo constituyen. Es por ello que en los últimos años se han destinado muchos esfuerzos al estudio de las diferentes actividades benéficas que estos péptidos pueden tener sobre el organismo, incluyendo su actividad antihipertensiva, antimicrobiana, opioide, inmunoestimuladora, acarreadora de minerales y antitrombótica, entre otras (Ryhänen *et al.*, 2001).

Estas moléculas son de interés para el sector industrial (alimentos y farmacéutica) ya que pueden ser incluidas en diversos alimentos y/o medicamentos para lograr su efecto en el organismo del consumidor final (Aimutis, 2004).

2.4.2 Liberación de péptidos bioactivos en leches fermentadas

Diversas investigaciones se han dedicado a verificar la obtención de péptidos bioactivos mediante el sistema proteolítico presente en BAL durante el proceso de fermentación (Korhonen *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 2008; Fitzgerald y Meisel, 2000; González *et al.*, 2011). Se han obtenido resultados variables debido a que cada microorganismo tiene o se adapta a diversos factores durante este proceso. Dentro de estos factores se encuentran la temperatura, el pH, la concentración de sustrato, el tipo de cepa microbiana y el tipo de caseína que hidrolizan en el primer paso de la proteólisis (Law y Haandrikman, 1997).

Se ha demostrado que las leches fermentadas con BAL, contienen péptidos bioactivos que tienen actividad biológica, que ayudan a contrarrestar algunas enfermedades en el ser humano. Un ejemplo de estos productos es la leche Evolus™, la cual fue la primera leche fermentada comercializada para este fin en Finlandia en el año 2000 (Berry, 2000).



Otras como Vita de Kaiku™ y Emmi-Evolus™, producidas en España y Portugal, respectivamente, se han comercializado en toda Europa (Mine et al., 2010). Otro ejemplo es el producto Calpis™, el cual es elaborado en Japón y se obtiene por fermentación mediante el uso cepas de *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Esta leche ha sido sujeta a varios estudios para corroborar su efecto antihipertensivo (Hata et al., 1996; Fitzgerald y Meisel, 2000; Korhonen y Pihlanto-Lepälä, 2006).

2.5 Hipertensión

La hipertensión arterial es una enfermedad caracterizada por un incremento de la presión sanguínea de las arterias. Esta enfermedad está asociada a un aumento en el riesgo de aterosclerosis (Kumar et al., 2009). La hipertensión crónica es el factor de riesgo más importante para desarrollar enfermedades cardiovasculares así como la enfermedad cerebrovascular y renal. Esta afección produce cambios en el flujo sanguíneo, causada por una disfunción de la capa interna de los vasos y la constipación de la pared de las arteriolas, que son las responsables de mantener el tono vascular periférico (Dreisbach et al., 2010)

La hipertensión es un problema de salud a nivel mundial y ha sido tratada con diversos medicamentos sintéticos que inhiben a la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Esta enzima participa en el mecanismo responsable de la alteración de la presión normal de la sangre, cuando esta circula a través de las venas y arterias del cuerpo humano (Maruyama y Susuki 1982; Maruyama et al., 1987). La ECA es una metaloproteasa dependiente de zinc presente en diversos tejidos como vasos sanguíneos, pulmón, riñón y en el corazón (cardiomiocitos y fibroblastos cardiacos). Es bien conocido que la ECA es una enzima que tiene actividad idéntica a la de una quinasa (Skeggs et al., 1956).

2.5.1 Sistema renina-angiotensina

El sistema renina-angiotensina consiste en una cascada de interacciones entre enzimas y sustratos que culminan con la producción de angiotensina II (figura 1) cuya síntesis depende, en gran parte, de la conversión de angiotensina I a través de la activación de ECA. Un aumento de la actividad de esta enzima, lleva a la degradación de bradiquinina, la cual es un vasodilatador que genera fracciones inactivas. La angiotensina II tiene propiedades profibróticas y vasoconstrictoras, lo que promueve el remodelamiento



miocárdico. El uso de inhibidores de ECA ayuda a prevenir eventos isquémicos y aterogénesis (Santos *et al.*, 2013).

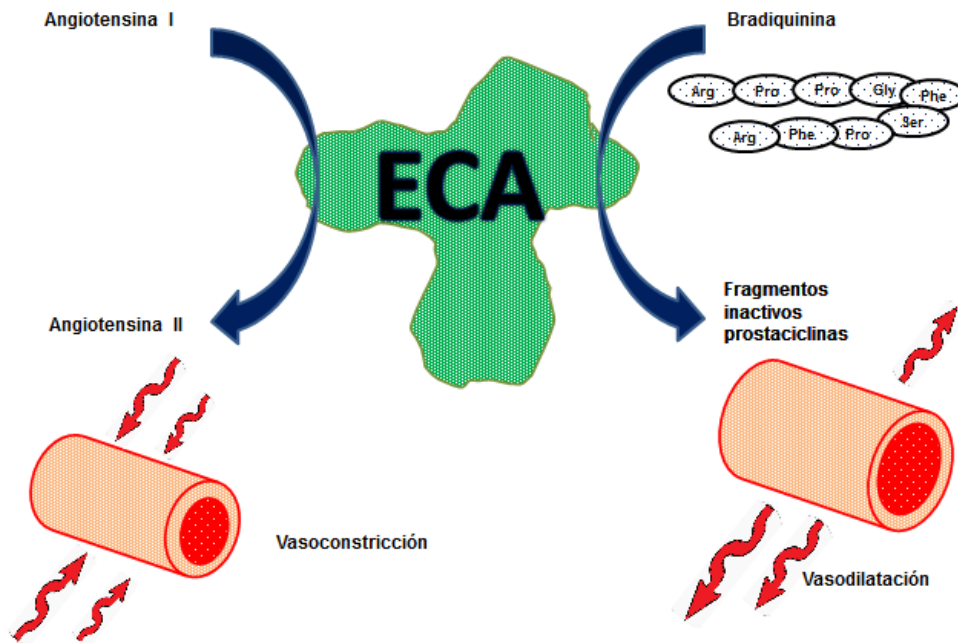


Figura 1. Reacciones catalizadas por la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

2.6 Péptidos antihipertensivos

Los péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina presentan una actividad menor a la de los fármacos, sin embargo, tienen las ventajas de no provocar efectos secundarios y ser más económicos. Los primeros inhibidores exógenos de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) con un efecto antihipertensivo *in vivo*, fueron descubiertos en veneno de serpiente. Posteriormente, se encontraron varios inhibidores en hidrolizados enzimáticos de proteínas presentes en alimentos, como caseína, suero, gelatina, levadura y maíz. Los péptidos inhibidores de ECA son los más comunes en las proteínas de los alimentos (Korhonen y Pihlanto-Lepälä, 2006). Una dieta rica en péptidos inhibidores de la ECA provoca una importante disminución en el desarrollo de la hipertensión (Hong *et al.*, 2008).

Los péptidos antihipertensivos son liberados durante la fermentación anaeróbica con BAL. (Matsui *et al.*, 2003). Estas hidrolizan las caseínas mediante su sistema proteolítico, lo que tiene como consecuencia la liberación de pequeñas fracciones peptídicas. Dentro de estas secuencias peptídicas, puede haber algunas con carácter antihipertensivo, las cuales inhiben la actividad de la ECA. Estos péptidos se caracterizan por tener un bajo peso molecular y se han aislado en leches fermentadas diversas (Ryhänen *et al.*, 2001).

Muchos de los inhibidores de la ECA, derivados de leche, se originan de la hidrólisis de caseínas (Maruyama *et al.*, 1987; Murayama y Susuki, 1982). Algunas de estas fracciones son las denominadas casokininas (Meisel, 1993).

La producción de péptidos con actividad antihipertensiva, se puede realizar mediante hidrólisis de diferentes tipos de enzimas (digestivas, microbianas o vegetales), mediante fermentación con diferentes tipos de microorganismos o mediante una combinación de ambos procesos (Korhonen y Pihlanto-Lepälä, 2006).

Diferentes estructuras de péptidos inhibidores aislados, indican que la unión a la enzima convertidora de angiotensina está influenciada por la secuencia del tripéptido IPP del extremo C-terminal del sustrato de donde se deriva esta relación. Este mecanismo no está completamente claro pero parece que la enzima prefiere sustratos o inhibidores competitivos que contienen residuos de aminoácidos hidrofóbicos en las tres últimas posiciones del extremo C-terminal. Muchos de los péptidos inhibidores conocidos contienen residuos de Pro, Lisina (Lys) o Arginina (Arg) en dicho extremo (Maruyama *et al.*, 1985; Quirós *et al.*, 2007).



Por otra parte, Meisel y col. (1997) propusieron que el mecanismo de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina presenta una interacción del inhibidor con un sitio de unión aniónico; esto explica que la carga positiva de los residuos de Arg y Lys presente una mayor actividad antihipertensiva.

La unión de los péptidos de la ECA está influida por la secuencia IPP, que puede interaccionar con tres regiones de su centro activo (Maruyama *et al.*, 1992). Así, los aminoácidos de carácter hidrofóbico, como Trp, Tyr, Phe o Pro, favorecen la unión a estas zonas. El péptido con secuencia C-terminal Phe-Ala-Pro, análogo al encontrado en el inhibidor presente en el extracto de veneno de serpiente es uno de los más favorables para unirse al centro catalítico (Araujo *et al.*, 2000).



3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar la capacidad antihipertensiva de fracciones peptídicas producidas en una leche fermentada por bacterias ácido lácticas, a través de ensayos enzimáticos para determinar el grado de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina.

3.2 Objetivos Específicos

- Fermentar leche con cultivos lácticos de *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Streptococcus thermophilus* 54-102 para determinar los cambios de pH producidos durante el proceso.
- Medir la concentración de grupos amino libres por medio de la técnica de ácido trinitrobencensulfónico obtenidos durante la fermentación para determinar el grado de proteólisis de cada microorganismo.
- Caracterizar las fracciones peptídicas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida para determinar la acumulación de péptidos de bajo peso molecular.
- Separar las fracciones peptídicas obtenidas durante la fermentación, por medio de HPLC para detectar la presencia de aminoácidos aromáticos.
- Evaluar el efecto antihipertensivo de las fracciones peptídicas obtenidas durante la fermentación mediante reacciones enzimáticas *in vitro*.



4. MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas *Streptococcus thermophilus* 54-102 y *Lactobacillus rhamnosus* GG utilizadas en este estudio fueron proporcionadas por el laboratorio de Biotecnología Alimentaria de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

4.1 Propagación de las cepas y preparación del cultivo iniciador

Las cepas puras fueron acondicionadas en caldo MRS. Se incubaron por 24 horas a 42°C. Después de la incubación se transfirió un mililitro del caldo inoculado a un tubo con 9 mL de una solución de leche descremada en polvo (Dairy Gold) al 10% (P/V) previamente pasteurizada a 90°C por 10 minutos. El tubo conteniendo dicha solución, se incubó nuevamente durante 24 horas a 42°C. Después de este último periodo de incubación, se realizó una tinción de Gram para descartar contaminación del cultivo.

En un matraz Erlenmeyer previamente esterilizado se pasteurizaron 100 mL de una solución de leche descremada en polvo al 10% (P/V) durante 10 minutos a 90°C. A este matraz se le adicionó 1 mL de la solución de leche inoculada e incubada. El matraz se incubó por 24 horas a 42°C. Este matraz fue el cultivo madre para cada uno de los microorganismos.

Al término del tiempo de incubación, se realizó una tinción de Gram para comprobar la pureza del cultivo madre. Se realizó la cuenta viable del microorganismo por conteo en placa en Agar MRS.

4.2 Fermentación

Para el proceso de fermentación, se prepararon tres sistemas: dos de ellos inoculados solamente con un microorganismo y el último inoculado con ambos. La concentración inicial de bacterias fue de aproximadamente 1×10^6 UFC para cada uno de los sistemas. La solución para la fermentación se preparó con leche descremada en polvo al 10 % P/V adicionada con 2% de lactosa (P/V). Esta solución se pasteurizó a 90°C durante 10 minutos antes de la inoculación.

Los sistemas estudiados se incubaron a 42°C. Las fermentaciones se realizaron por triplicado. Se tomaron 5 mL de muestra cada 2 horas para determinar el pH. Se realizaron fermentaciones previas para explorar los puntos de muestreo, el



tiempo de fermentación y los cambios de pH. De esta forma, se estandarizó el proceso de fermentación.

Después de las fermentaciones exploratorias, se determinó que el proceso se detuviera al alcanzar un pH de 4.5 o cuando se obtuvieran tres mediciones sin cambio de pH, independientemente del valor. Las muestras se centrifugaron a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C (centrífuga Eppendorf) con la finalidad de eliminar la biomasa y proteínas de alto peso molecular. Los sobrenadantes de las muestras centrifugadas se almacenaron en congelación para su análisis posterior. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

4.3 Determinación de la actividad proteolítica por el método del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS)

Para la cuantificación de los grupos amino libres se utilizó la técnica del TNBS propuesta por Adler en 1979 la cual se basa en la reacción del ácido trinitrobencensulfónico con las aminas primarias en condiciones ligeramente alcalinas (pH 8.2) (Guadix *et al.*, 2000). Esta técnica mide grupos amino libres en hidrolizados proteicos. La reacción que se lleva a cabo se muestra en la figura 2.

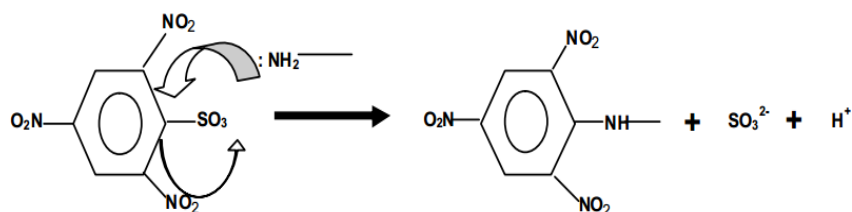


Figura 2. Reacción de TNBS con los grupos amino libres (Adler, 1979).

La preparación de las soluciones empleadas en este análisis se muestra en el anexo 8.2.1.

Se agregaron 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.2125 M, pH 8.2 en tubos de ensayo forrados con papel aluminio. El procedimiento utilizado fue el siguiente:

1. Se agregaron 250 μL de muestra a cada tubo. El blanco contenía 250 μL de agua desionizada.
2. Se agregó 1 mL de la solución de TNBS al 0.10% a cada tubo, agitándolos en vortex hasta homogenización completa.
3. Se incubaron las muestras durante una hora a 50°C.
4. Se detuvo la reacción con 4 mL de HCl 0.1 N y los tubos se agitaron nuevamente en vortex.
5. Se leyó espectrofotométricamente a 340 nm.

4.4 Análisis de péptidos de bajo peso molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE-Tricina

La electroforesis es una técnica de separación basada en la migración de las moléculas cargadas en un campo eléctrico. Las moléculas se separan en función de su carga eléctrica, desplazándose al electrodo de carga contraria y a mayor velocidad cuanto mayor es la carga de la molécula (Lodish *et al.*, 2005). Una de las técnicas más utilizadas para analizar mezclas de proteínas en gel de poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés), es la que se lleva a cabo en presencia del detergente duodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE). En esta técnica se mezclan las proteínas con el detergente aniónico SDS para formar complejos desnaturalizados cargados negativamente (Lomonte, 2009). La separación está en función del tamaño, lo que permite determinar el peso molecular de las proteínas.

4.4.1 Preparación de geles

Los protocolos de preparación de todas las soluciones para el análisis de electroforesis se muestran en el anexo 8.3

El gel de separación se preparó al 5.5% de C y 16.5% de T. El gel se preparó con una solución amortiguadora de Tris-HCl a un pH de 8.45. La solución se preparó siguiendo el protocolo del apéndice 1.a. El persulfato de amonio preparado al 10% con el amortiguador tris-HCl a pH 8.45 y el TEMED, se agregaron después de 15 minutos de desgasificación por medio de agitación lenta a vacío. La solución se transfirió a los cristales de formación del gel hasta aproximadamente 4.5 cm de altura.

Después de 2 minutos de iniciar la polimerización, se agregó agua desionizada para evitar la deshidratación del gel. Los geles se polimerizaron por alrededor de 24 horas, antes de colocar el gel de concentración. Dicho gel se preparó al 4% de T, con un amortiguador



Tris-HCl a pH 6.6. La mezcla se preparó de acuerdo al procedimiento descrito en el anexo 1.b. El persulfato preparado al 10% con una solución amortiguadora a pH 6.6 y el TEMED se agregaron de la misma forma que en el gel de separación. Se retiró el agua desionizada que se colocó en el gel de separación, se vació el gel de concentración y se colocaron los peines, dejando polimerizar durante aproximadamente dos horas.

4.4.2 Preparación de muestras y electroforesis

Se utilizaron muestras obtenidas durante la fermentación de *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Streptococcus thermophilus* 54-102 y del cultivo mixto. Se tomaron las muestras aleatorias de los tiempos de fermentación, tomando como criterio los cambios en la concentración de grupos amino libres. Los tiempos para la fermentación fueron a las 12, 26, 28, 32, 36 y 56 horas para *Lactobacillus rhamnosus*; a las 4, 6, 8, 10 y 11 horas para *Streptococcus thermophilus* 54-102 y a las 15, 21, 27, 39 y 41 horas para el cultivo mixto. Las muestras se centrifugaron en una microcentrífuga SORVALL *fresco* a 10 000 rpm por 10 minutos a 4°C. Del sobrenadante se tomaron 40 µL que se adicionaron en viales, posteriormente se adicionaron 20 µL de solución buffer colorante y 3 µL de β-mercaptoetanol.

Para el cálculo de los pesos moleculares, se tomaron 4µL del estándar de polipéptidos (Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards Bio-Rad), se adicionaron 20µL de solución reguladora Tris-HCl a pH 6.8, 20µL de agua desionizada, 20µL de solución buffer colorante y 3µL de β-mercaptoetanol. Las muestras y el estándar se incubaron por 30 minutos a 40°C.

Se removieron los peines del gel de concentración y se pasaron los geles al equipo MiniProtean II para iniciar la corrida. Se depositaron 15µL de muestra en los carriles formados en el gel de acrilamida. Se llevó a cabo la electroforesis a 30V hasta que las muestras entraron por completo al gel de separación (aproximadamente 1 hora). Posteriormente, se cambió el voltaje a 95V hasta que la migración de las muestras llegara al final del gel (aproximadamente 5 horas).

Una vez terminada la electroforesis, se fijaron los péptidos sumergiendo los geles en una solución fijadora de metanol al 50% y ácido acético al 10%, por una hora. La tinción se realizó después del tiempo de fijación, con una solución de azul de Comassie, por dos horas. Los geles se destiñeron con ácido acético al 7.5% (Schagger y Von Jagow, 1987).



4.5 Separación de péptidos con aminoácidos aromáticos por HPLC

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica (Sierra *et al.*, 2009). La separación consiste en la mezcla de moléculas (muestra) la cual interacciona con un medio o matriz de soporte que se denomina fase estacionaria, un segundo medio (fase móvil) que es inmisible con la fase estacionaria se hace fluir a través de esta para eluir a las moléculas de la muestra (Nollet y Toldrá, 2013). La técnica utilizada fue una adaptación para péptidos de bajo peso molecular (González *et al.*, 2011).

Las muestras se descongelaron, se centrifugaron a 1000 rpm a 4°C y se inyectaron en un equipo HPLC modular (Perkin Elmer, Series 200), con una columna de exclusión molecular (SEPAX Technologies, Inc., SRT SEC-150, tamaño de partícula 5µm, tamaño de poro 150 Å, 300 x 7.8 mm). La fase móvil utilizada fue un amortiguador de fosfatos pH 6.8. Se inyectaron 20 µL de muestra. La corrida se realizó con un flujo isocrático de 0.25 mL/min durante 70 min a temperatura ambiente. La detección se realizó a 220nm con un detector de arreglo de diodos (Applied Biosystems 1000S).

4.6 Determinación de la actividad antihipertensiva de péptidos

El fundamento de este método es la conversión de la angiotensina I a II, hidrolizando el enlace peptídico entre fenilalanina y la histidina dando como producto el dipéptido histidil leucina (Cushman *et al.*, 1977). En la determinación de la ACE de este experimento se utilizó como sustrato el hipuril histidil leucina (HHL); formándose como subproducto histidil leucina y ácido hipúrico donde el ácido puede ser extraído y detectado espectrofotométricamente a 230 nm (Rojas- Ronquillo, 2009).

En este trabajo la actividad antihipertensiva se determinó utilizando el siguiente protocolo:

1. Se tomaron 80µL de las muestras previamente centrifugadas a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
2. Se agregaron a los sobrenadantes 200 µL de una solución 5mM de hidrato de N Hipuril Histidil Leucina (HHL) (Sigma Aldrich) en amortiguador de borato 0.1 M a pH 8.3. La solución se preparó el mismo día del análisis.



3. A los tubos de reacción, se añadieron 20 μL de ECA de porcino (Sigma Aldrich) preparada en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M. El tubo se mezcló en vortex durante 1 minuto.
4. Los tubos con ECA, se incubaron durante 1 hora con 15 minutos a 37°C .
5. La reacción se detuvo agregando 250 μL de ácido clorhídrico 1N y agitando el tubo en vortex. El ácido hipúrico obtenido de la reacción enzimática se extrajo con 1.7 mL de acetato de etilo.
6. Los tubos se centrifugaron a 4500 rpm durante 5 minutos a 4°C , para lograr la separación de fases.
7. De la fase orgánica se tomaron 400 μL , calentándose durante 30 minutos a 95°C .
8. El residuo se resuspendió en 2 mL de agua destilada agitándose 1 minuto en vortex antes de llevar a cabo la lectura.
9. La absorbancia se leyó a 220 nm.

Para obtener el valor correspondiente a 0% de actividad, se preparó un tubo de reacción con 200 μL de HHL y 20 μL de agua destilada mientras que para obtener una lectura de 100% de actividad se preparó un tubo de reacción de 80 μL de amortiguador de borato sin sustrato y 20 μL de enzima. El blanco se preparó con 80 μL de agua destilada, 200 μL de HHL y 20 μL de enzima. Todos los tubos recibieron el mismo tratamiento que el de las muestras.

El porcentaje de inhibición fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{(B - A)}{(B - C)} \times 100$$

Donde:

A es la absorbancia de la reacción con enzima, sustrato e inhibidor (muestra)

B es la absorbancia de la reacción con enzima y sustrato (100% de actividad)

C es la absorbancia de la prueba con sustrato, sin enzima ni inhibidor (0% de actividad)

La preparación de las soluciones utilizadas para realizar el experimento se encuentra descrita en el apéndice 8.4.



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Cambios de pH durante la fermentación

El pH disminuyó de manera constante en los tres sistemas estudiados hasta alcanzar un pH entre 4.5 y 5 (Fig. 3). El sistema fermentado con *Lactobacillus rhamnosus* GG tardó más tiempo (56 horas) en alcanzar el pH de referencia para dar por terminada la fermentación.

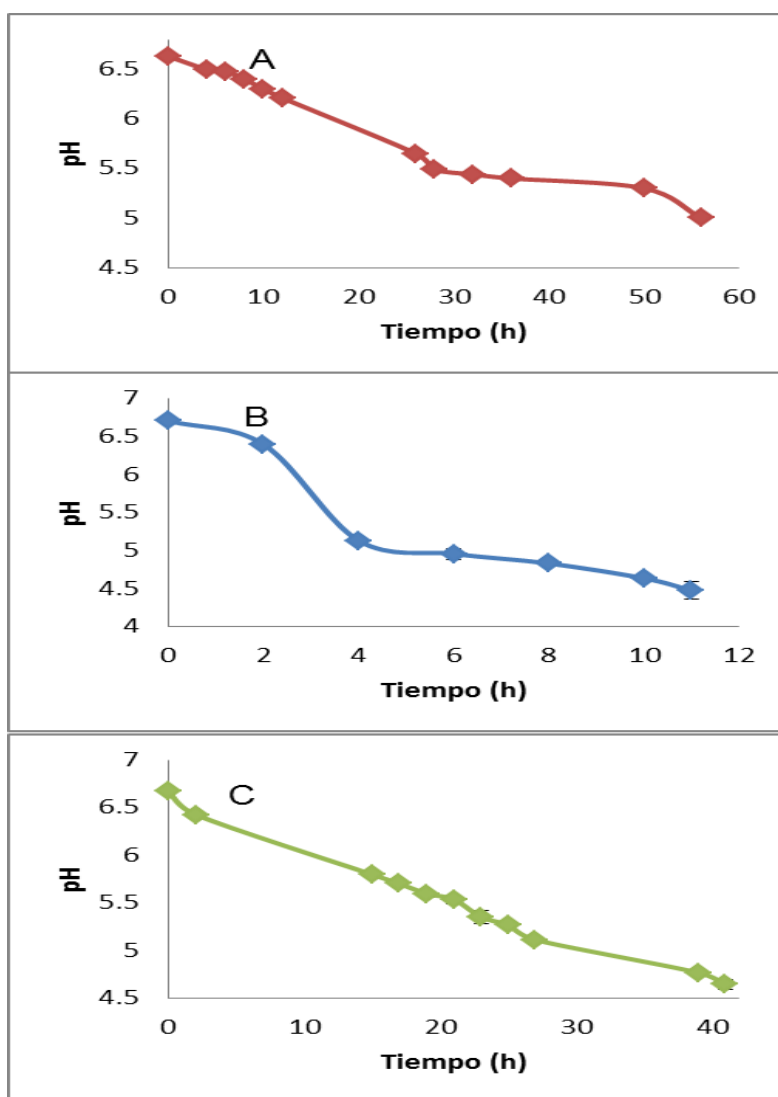


Figura 3. Cambios de pH durante la fermentación de leche por *Lactobacillus rhamnosus* GG (A), *Streptococcus thermophilus* 54-102 (B) y cultivo mixto (C).

El tiempo de descenso del pH pudo deberse al tipo de proceso fermentativo y al estrés del microorganismo ya que, al momento de ser inoculada, dicha cepa había pasado 3 días a 4°C. Se ha observado que las bacterias lácticas homofermentativas tienen la capacidad de fermentar la lactosa en menor tiempo con respecto a otros microorganismos puesto que toman a este azúcar como primera fuente de carbono para la producción de ácido láctico (Fitzgerald y Murray, 2006).

En el caso de la fermentación con *Streptococcus thermophilus* 54-102 (Fig. 3), se observó una disminución de pH más rápida (11 horas) en comparación con la observada para *Lactobacillus rhamnosus* GG. Algunos autores han descrito que la disminución del pH durante el proceso de fermentación es debida a dos factores importantes: a la generación de biomasa y a la conversión de lactosa en ácido láctico. Estos dos factores suelen ser determinantes en las diferencias observadas entre dos sistemas de fermentación con distintos microorganismos, ya que su adaptación es dependiente de la capacidad de utilización de las fuentes de carbono y de nitrógeno (Pearce y Flint, 2002).

Por otro lado, algunos estudios han demostrado que la disminución de pH en un sistema de fermentación de leche sigue un patrón similar al observado en este estudio (Rajagopal y Sandine, 1990; Donkor *et al.*, 2007; Quirós *et al.*, 2007). Adicionalmente, la fermentación con *Streptococcus thermophilus* 54-102 mostró una disminución de pH 4.5 a 4 en un periodo de 12 horas. Esta disminución se debe a la adaptación del microorganismo al medio de fermentación y a la fuente de aminoácidos libres disponibles para su crecimiento (Rojas-Ronquillo, 2009).

En el sistema donde se inocularon los dos microorganismos, se observó una disminución hasta pH 5, alrededor de las 41 horas (Fig. 3). Se decidió detener la fermentación en este valor, ya que en pruebas preliminares de simbiosis, los mismos microorganismos no lograron disminuir el pH hasta 4.5. Se sabe que en sistemas simbióticos donde participa *Streptococcus thermophilus* 54-102, su crecimiento y adaptación es dependiente del metabolismo del otro microorganismo ya que la liberación de algunos aminoácidos esenciales es necesaria para su crecimiento, con el consecuente retraso en la formación de biomasa y, principalmente, de la conversión de lactosa (Rajagopal y Sandine, 1990; Moreira *et al.*, 2000).



Por otro lado, la disminución de pH en sistemas lácteos fermentados con *Streptococcus thermophilus* se ve retrasado por la utilización de dos fuentes de carbono diferentes. En primer lugar se realiza la hidrólisis de la lactosa y se sabe que este microorganismo tiene una curva de crecimiento diaúxica. Esto es debido a que *Streptococcus thermophilus* es capaz de utilizar la galactosa liberada como fuente de carbono, fermentándola por la vía de las pentosas fosfato. Sin embargo, en sistemas mixtos, la acidificación del medio se ve limitada por la fermentación solo de la glucosa liberada del disacárido hidrolizado (García-Garibay, 1993).

5. 2 Determinación de grupos amino libres durante la fermentación láctica

Para evaluar el nivel de proteólisis durante la fermentación, se realizó un análisis de concentración de grupos amino libres por la técnica de TNBS.

Durante la fermentación con *Lactobacillus rhamnosus* GG se observó una proteólisis inicial mayor en comparación con la de *Streptococcus thermophilus* 54-102 (Fig. 4-a). Sin embargo, en el transcurso de la fermentación, la concentración de grupos amino libres, a pesar de permanecer aparentemente constante (de 0.544 a 0.639 mg/L) presentó diferencia significativa ($P=0.05$). Estos resultados estadísticos mostraron que hubo un aumento en la concentración de grupos amino libres al final de la fermentación (Fernández-Espla y Rul, 1999).

En general, las diferencias en la concentración de grupos amino libres se deben a la especificidad del sistema proteolítico de cada microorganismo. Algunas investigaciones similares a este trabajo, realizadas con el género *Lactobacillus casei*, han demostrado que no existe variación de la concentración de grupos amino libres hasta las 21 horas de fermentación (Rojas-Ronquillo, 2009). También se ha determinado que las diferencias pueden deberse al método, ya que en el caso de las fermentaciones con hidrólisis de caseínas, la disminución de grupos amino libres se puede deber en gran medida a la precipitación de las proteínas de alto peso molecular. Dichas proteínas, a pesar de estar fraccionadas, sufren un proceso de floculación debido a que se encuentran en un medio cercano a su punto isoeléctrico. Este fenómeno es causado por la generación de ácido láctico, lo cual provoca la separación de las caseínas (Rojas-Ronquillo, 2009; González et al., 2011).



Durante la proteólisis con *Streptococcus thermophilus* 54-102, se observó un comportamiento diferente durante la cinética de fermentación con respecto al obtenido con *Lactobacillus rhamnosus* GG. Al inicio de la fermentación con *Streptococcus thermophilus* 54-102, se encontró una alta actividad proteolítica que disminuyó a las 7 horas de fermentación. Sin embargo, al final del proceso se obtuvo una concentración de grupos amino libres de 0.24 mg/L (Fig. 4-b).

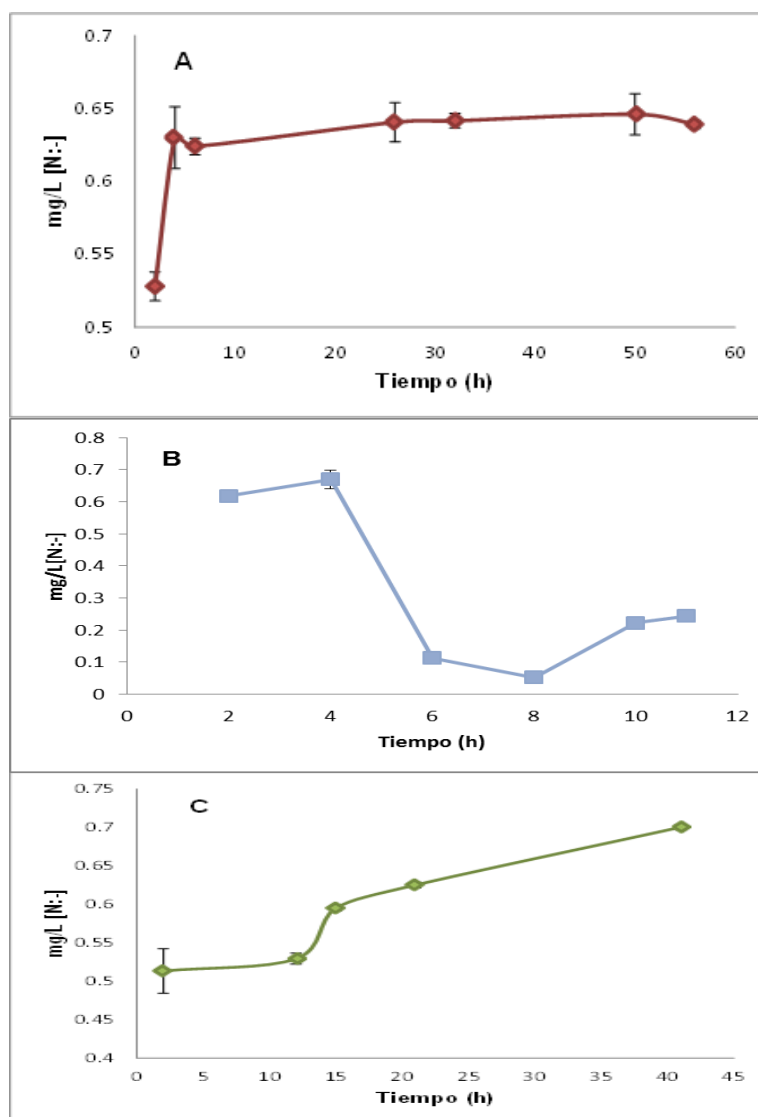


Figura 4. Concentración de grupos amino libres durante la fermentación de leche con (A) *L. rhamnosus* GG, (B) *S. thermophilus* 54-102 y (C) Cultivo mixto.

Se sabe que algunas especies de *Streptococcus thermophilus* tienen baja actividad proteolítica asociada a las proteasas de la pared celular. Además, se ha demostrado que una actividad proteolítica mayor se debe a peptidasas intracelulares que se liberan por lisis celular (Rojas-Ronquillo, 2009).

Se ha observado que las diferencias entre los sistemas proteolíticos de bacterias lácticas, se deben principalmente a la proteólisis inicial (Chang *et al.*, 2014). Las especies de estreptococos, al tener mayores requerimientos nutricionales de aminoácidos, en comparación con especies de lactobacilos, deben tener mayor capacidad de hidrólisis inicial de proteínas. Fernández-Espla y Col. (2000), aislaron por primera vez una proteasa ligada a la pared celular de *Streptococcus thermophilus* CNRZ 385. Esta enzima es una serino-proteasa prolino específica altamente activada por iones calcio, presenta una especificidad intermedia entre las proteasas de lactococos, conocidas como PI y PIII. Esta enzima fue nombrada como PrtS.

Al contrario de los lactobacilos, la mayoría de las peptidasas, di y tri peptidasas y aminopeptidasas de estreptococos son intracelulares. Se ha observado que en *Streptococcus thermophilus* existen hasta 15 peptidasas como oligopeptidasas, dipeptidasas y aminopeptidasas homólogas a las presentes en *Lactococcus lactis*. Esto es de suma importancia, ya que el sistema de peptidasas de *Streptococcus thermophilus* es un sistema más complejo y todo el corte peptídico se realiza al interior de la célula con una excreción muy disminuida de péptidos de cadena corta (Rul y Monnet, 1997).

Algunas peptidasas de estreptococos son aminopeptidasas A, las cuales son específicas para aminoácidos ácidos y otras como las PepX son específicas para prolina (Rul y Monnet, 1997). Letort y Julliard (2001) aislaron e identificaron una aminopeptidasa intracelular X-prolil dipeptidil aminopeptidasa en *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4, la cual es específica para el corte de fracciones en terminación de prolina en el carbono terminal.

En la fermentación con el cultivo mixto (Fig. 4-c) se observó un aumento en la concentración de grupos amino libres durante todo el proceso de fermentación. La concentración final podría deberse a dos factores importantes: 1) grupos expuestos a causa de la desnaturalización parcial de las caseínas debido a la formación de ácido láctico provocando una disminución del pH hasta 4.5, valor del punto isoeléctrico de este grupo de proteínas, por lo que los grupos amino, principalmente de la KCN, se exponen



libremente (Yamamoto *et al.*, 1994) y 2) acción del sistema proteolítico de *Lactobacillus rhamnosus* GG que genera la liberación inicial de péptidos y aminoácidos libres para el desarrollo y crecimiento de *Streptococcus thermophilus* 54-102. Distintas investigaciones, (Quirós, 2007; Rojas-Ronquillo, 2009) han demostrado que el crecimiento y la adaptación de especies de estreptococos son dependientes del metabolismo del otro microorganismo (Fernandez-Espla *et al.*, 2000). Después de contar con los aminoácidos necesarios para su crecimiento, la acción proteolítica de *Streptococcus thermophilus* continúa hasta el final de la fermentación (Fitzgerald y Murray, 2006).

5.3 Separación de péptidos por electroforesis

Al realizar la electroforesis a las muestras obtenidas durante la fermentación con *Lactobacillus rhamnosus*, se encontraron bandas correspondientes a péptidos menores a 1.4 kDa (Fig. 5). Muchos de los péptidos con funciones bioactivas que se encuentran reportados en la bibliografía, son menores a 10 kDa (Rojas-Ronquillo, 2009)

En la Fig. 5, se observa un incremento en la concentración de péptidos de bajo peso molecular y una disminución, tanto en la concentración de caseínas (c) como de proteínas de suero (a y b).

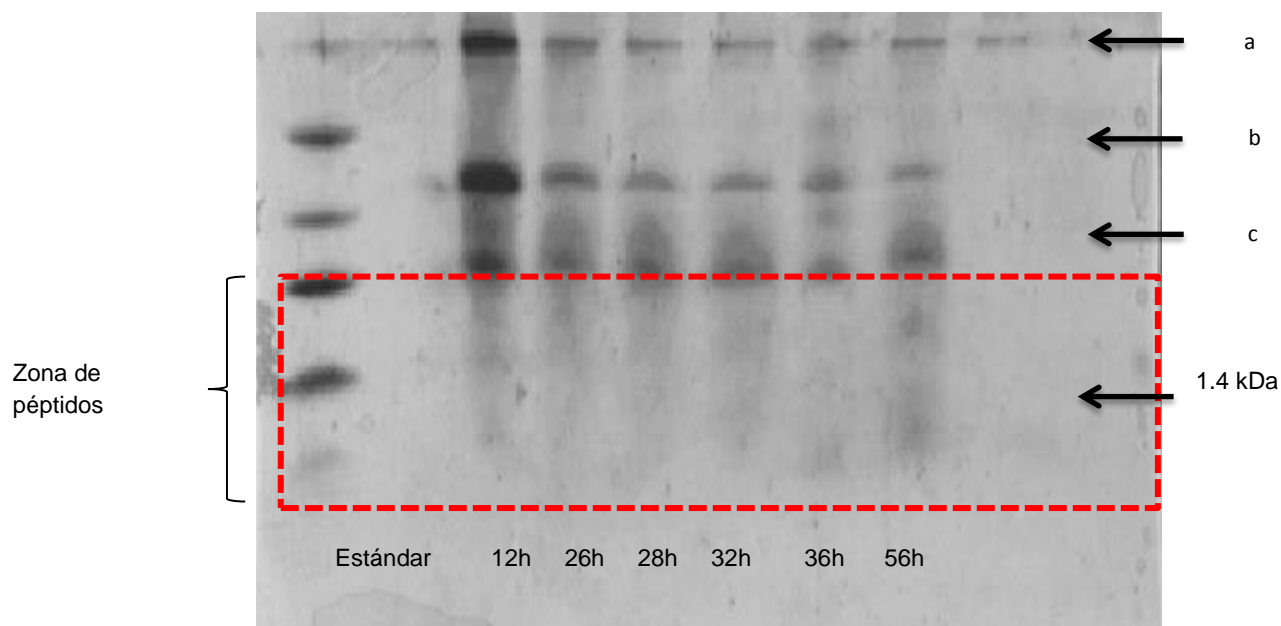


Figura 5 Separación de péptidos presentes durante la fermentación de leche al 10% con *Lactobacillus rhamnosus* GG. (c) CN, (b) BLG y (a) ALA.

En el análisis por Image-J, se observó una disminución en la concentración de las proteínas de peso molecular mayor a 14.4 kDa. Del mismo modo, desde el primer tiempo de monitoreo se identificaron hasta 5 péptidos menores a 14.4 kDa. Se ha observado que la actividad proteolítica de las bacterias lácticas continúa y se mantiene activa durante el proceso de fermentación. Varios autores han destacado que el origen de péptidos provenientes de proteínas del suero, es en general de mayor importancia debido a que el fraccionamiento de BLG es superior por su concentración de prolina, ya que las proteinasas y peptidasas del sistema proteolítico de bacterias lácticas son prolino-específicas (Gasson y de Voss, 1994; Ortíz-Chao *et al.*, 2009).

En el caso de la fermentación con *Streptococcus thermophilus* (Fig. 6), no se observó una concentración alta de péptidos menores a 1.4 kDa, a pesar de haber encontrado una disminución en la concentración de proteínas de peso molecular mayor a 14.4 kDa. Estos datos coinciden con los resultados obtenidos durante el análisis de grupos amino libres por el método de TNBS. Se observó una proteólisis muy alta al inicio de la fermentación, derivando en la disminución en la concentración de caseína.

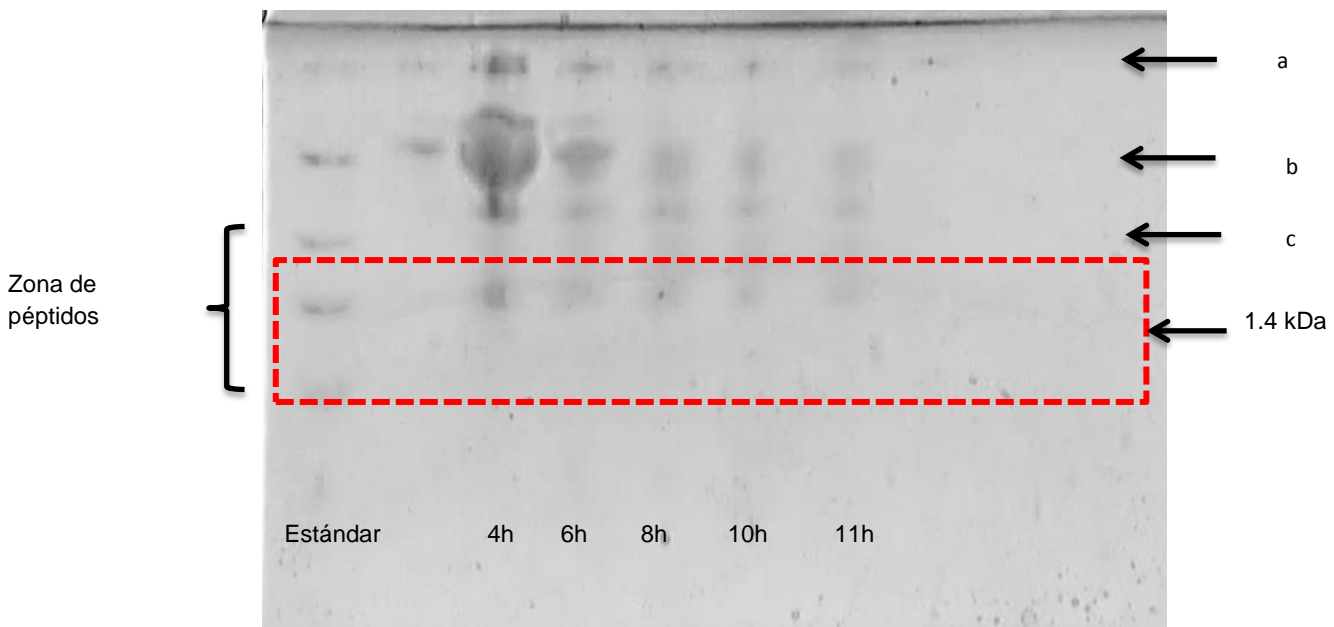


Figura 6. Separación de péptidos presentes durante la fermentación de leche al 10% con *Streptococcus thermophilus* 54-102. (c) CN, (b) BLG y (a) ALA

Se ha observado que debido a sus requerimientos nutricionales, *Streptococcus thermophilus* es una especie que tiene una alta actividad de la proteinasa PrtS al inicio de las fermentaciones, para obtener los aminoácidos necesarios para su sobrevivencia. Esta actividad disminuye ya que el corte peptídico se lleva al interior de la célula al contrario de lo que ocurre en otras bacterias lácticas donde hay un fraccionamiento peptídico tanto en la pared celular como al interior (Chang *et al.*, 2014).

Por otro lado, se ha demostrado que *Streptococcus thermophilus* es un microorganismo que libera al medio péptidos con aminoácidos aromáticos en su estructura, principalmente en el extremo C-terminal (Chang *et al.*, 2014). Esto remarca la importancia de los resultados en obtenidos en el presente trabajo, ya que se ha demostrado que estructuras peptídicas con aminoácidos aromáticos, muestran actividad antihipertensiva (Hong *et al.*, 2008).

En la Figura 7, se observa que, al realizar la fermentación con un sistema inoculado con ambos microorganismos se generó una mayor concentración de péptidos de bajo peso molecular, que con los sistemas inoculados con un solo microorganismo. Al mismo tiempo, se observó una disminución en la concentración de las proteínas de peso molecular mayor a 14.4 kDa, igual que en los otros sistemas bajo estudio. Sin embargo, al llevar a cabo el análisis con el software Image-J, se detectaron péptidos con peso molecular menor a 1.4 kDa. Es bien conocido que, en algunos sistemas simbióticos, existe un mecanismo de protooperación el cual se encuentra regulado por la liberación de aminoácidos esenciales para una de las especies presentes en el medio (Leroy y De Vuyst, 2004).

El patrón de péptidos liberados observado en el sistema mixto fue diferente al encontrado en los sistemas inoculados con un solo microorganismo. Mientras que en la leche inoculada únicamente con *S. thermophilus*, se observó una baja concentración de péptidos de bajo peso molecular durante toda la fermentación, en la leche fermentada con *L. rhamnosus* se encontró una concentración constante desde la mitad de la fermentación hasta el final de la misma.



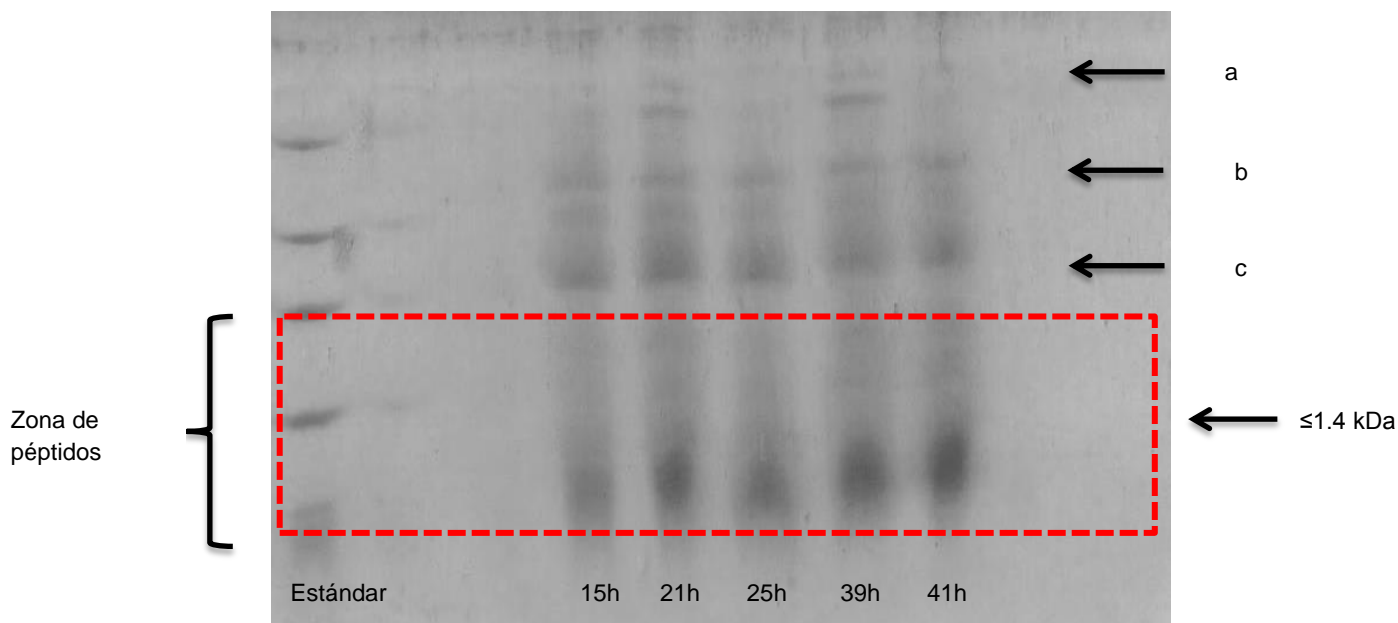


Figura 7. Separación de péptidos presentes durante la fermentación de leche al 10% con *L. rhamnosus* GG y *Streptococcus thermophilus* 54-102. (c) CN, (b) BLG y (a) ALA

La concentración de péptidos obtenidos en el sistema combinado aumentó durante todo el estudio. Estos resultados son consistentes con los observados en el análisis de grupos amino libres. La importancia de encontrar péptidos con pesos moleculares menores a 10 kDa, radica principalmente en que, como ya se mencionó anteriormente, las estructuras reportadas con actividad antihipertensiva son fragmentos peptídicos de pesos moleculares no mayores a 10 kDa (Matsufuji *et al.*, 1994). También se encontró que la liberación de péptidos durante la fermentación siguió el mismo patrón que el estudio realizado por Rojas-Ronquillo y col. en 2012, donde además, encontraron que la actividad antihipertensiva estaba relacionada con la producción de péptidos de bajo peso molecular.

5.4 Identificación de aminoácidos aromáticos en fracciones peptídicas

Diferentes autores han reportado que los péptidos antihipertensivos, tienen en sus estructuras aminoácidos aromáticos (Cheung *et al.*, 1980; Rokka *et al.*, 1997; González *et al.*, 2011). Debido a la importancia de la presencia de este tipo de aminoácidos en las cadenas de péptidos con carácter antihipertensivo, se realizó la

separación a 257 nm para detectar la presencia de fenilalanina y a 280 nm para identificar la presencia de triptófano y tirosina.

Se analizaron las fracciones peptídicas correspondientes al inicio, a la mitad y al final de cada fermentación. En la figura 8-I se observa que, al inicio de la fermentación con *Lactobacillus rhamnosus* GG (Fig. 8-IA) a 257 nm se encontraron fracciones de 8.5 kDa de peso molecular con presencia de fenilalanina, con un tiempo de retención (t_R) de 35 min. No obstante, durante el proceso de fermentación esta fracción desapareció de manera gradual. En la figura 8-IB se muestra cómo la concentración de esta fracción peptídica disminuyó y desapareció completamente al final del estudio (Fig. 8-IC).

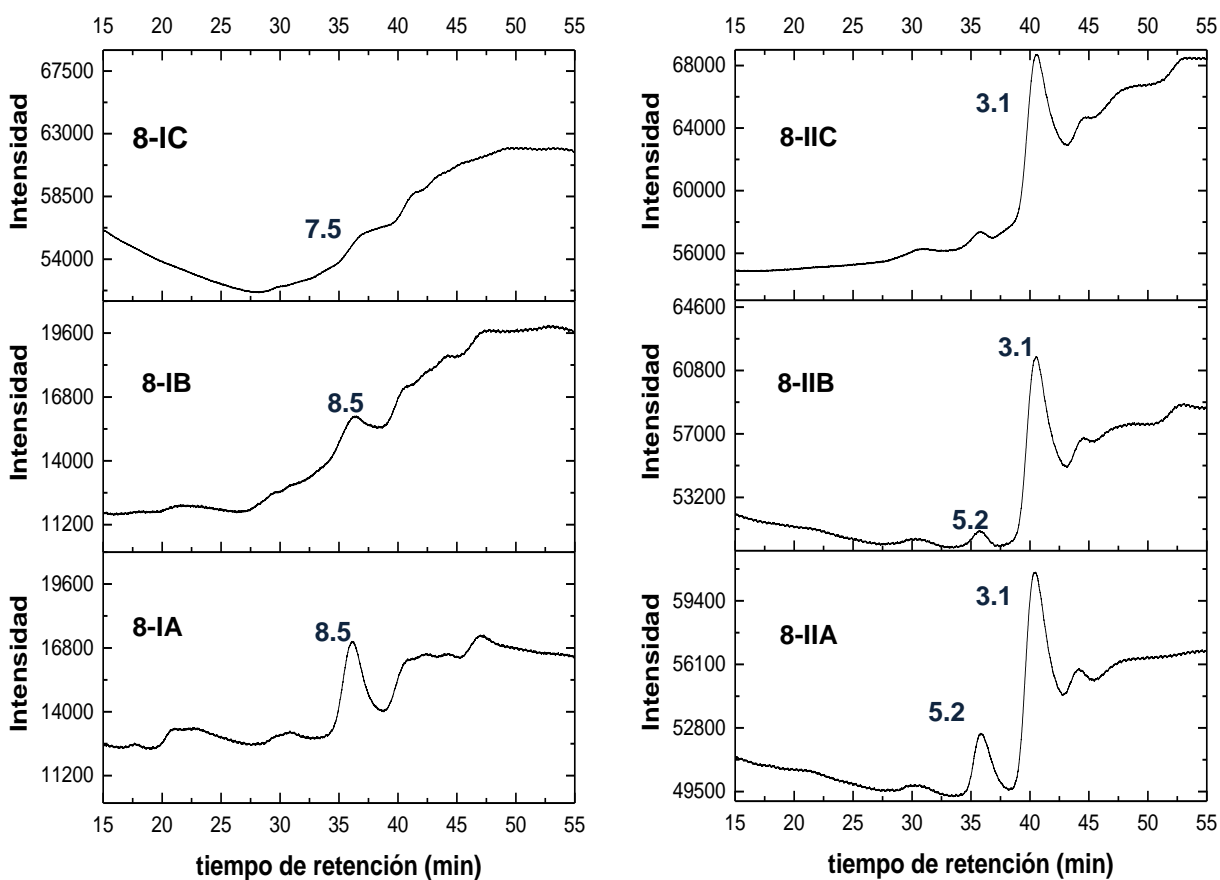


Figura 8. Separación de péptidos producidos por *Lactobacillus rhamnosus* GG por HPLC en columna de exclusión de tamaño a 257 nm (serie 8-I) y 280 nm (serie 8-II). (A) inicio de fermentación, (B) mitad de fermentación y (C) final de la fermentación.

En el caso del análisis a 280 nm (Fig. 8-II), al inicio de la fermentación se observaron dos fracciones peptídicas de pesos moleculares de 5.2 y 3.3 kDa con $t_R=35$ y 40 min

respectivamente (Fig. 8-IIA) con presencia de Trp y Tyr. Sin embargo, después de 21 horas de la fermentación (Fig. 8-IIB), la fracción de 3.3 kDa ($t_R=40$ min) permanece aparentemente constante durante todo el proceso fermentativo, lo cual podría indicar la presencia de un péptido acumulado en la fermentación conteniendo residuos de Tyr y Trp.

Según Gasson y de Vos (1994), las BAL prefieren a las caseínas en lugar de las proteínas del suero para iniciar la cascada de reacciones proteolíticas. A pesar de ello, a partir de la BCN, se generan más de 100 oligopéptidos con tamaños de 4 a 30 residuos de aminoácidos, por la acción de PrtP. Estos péptidos generados son de cadena superior a 3 aminoácidos con concentraciones traza de fenilalanina. Por ello, la presencia de fenilalanina no es constante durante el tiempo que dura la fermentación, pues *Lactobacillus rhamnosus* tiene necesidades de este aminoácido para su metabolismo (Morishita y Deguchi, 1999).

La presencia de aminoácidos aromáticos en las fracciones peptídicas, se debe al sistema proteolítico particular de cada BAL. Al final del proceso proteolítico, las peptidasas intracelulares cortan las fracciones peptídicas en el interior de la célula y excretan las fracciones que no utilizan. Peptidasas como la PepX, PepO, PepF, PepT pueden realizar los cortes de péptidos en la parte hidrofóbica de la secuencia peptídica y algunas veces los péptidos excretados acumulados poseen aminoácidos aromáticos en su estructura (Kunji *et al.*, 1996). Adicionalmente se sabe que este tipo de estructura se acopla mejor al sitio activo de la ECA, provocando su inhibición (Araujo *et al.*, 2000).

En el análisis de las fracciones peptídicas obtenidas durante la fermentación con *Streptococcus thermophilus* se observó una proteína de 46.9 kDa con presencia de Phe (Fig. 9-IA). Esta fracción podría provenir de la seroalbúmina bovina que durante la fermentación fue fraccionada, o bien, de algunas proteínas asociadas en polímeros, lo cual es muy común en ciertas condiciones de temperatura y pH para algunas caseínas, principalmente BCN (Walstra *et al.*, 1987). Esta proteína desapareció durante el proceso de fermentación llevado a cabo en el presente trabajo.

Del mismo modo, al inicio de la fermentación, se observó una fracción peptídica de 8.8 kDa la cual permaneció en una concentración aparentemente constante (Fig. 9-IB y 9-IC). Muchas de estas fracciones se producen desde el primer rompimiento de proteínas por la proteinasa PrtS de *Streptococcus thermophilus* 54-102. Esta proteinasa se activa cortando las proteínas de la leche para que el microorganismo obtenga los aminoácidos



necesarios para su sobrevivencia. Estos péptidos fraccionados, son transportados al interior de la célula y, al mismo tiempo, algunos se excretan, siendo estos últimos los que presentan actividad antihipertensiva, incluso desde el inicio del proceso fermentativo (Chang *et al.*, 2014).

En la presente investigación, desde el inicio de la fermentación, se identificaron dos péptidos con residuos de Tyr y Trp (Fig. 9-IIA) con pesos moleculares de 8.8 y 5.0 kDa ($t_R=35$ y 40 min, respectivamente). En la parte intermedia de la fermentación se identificó un péptido de 3.2 kDa (Fig. 9-IIB y C). Al final de la fermentación, estos tres péptidos fueron identificados. También se observó un aumento en la concentración del péptido de 3.2 kDa (Figura 9-IIC).

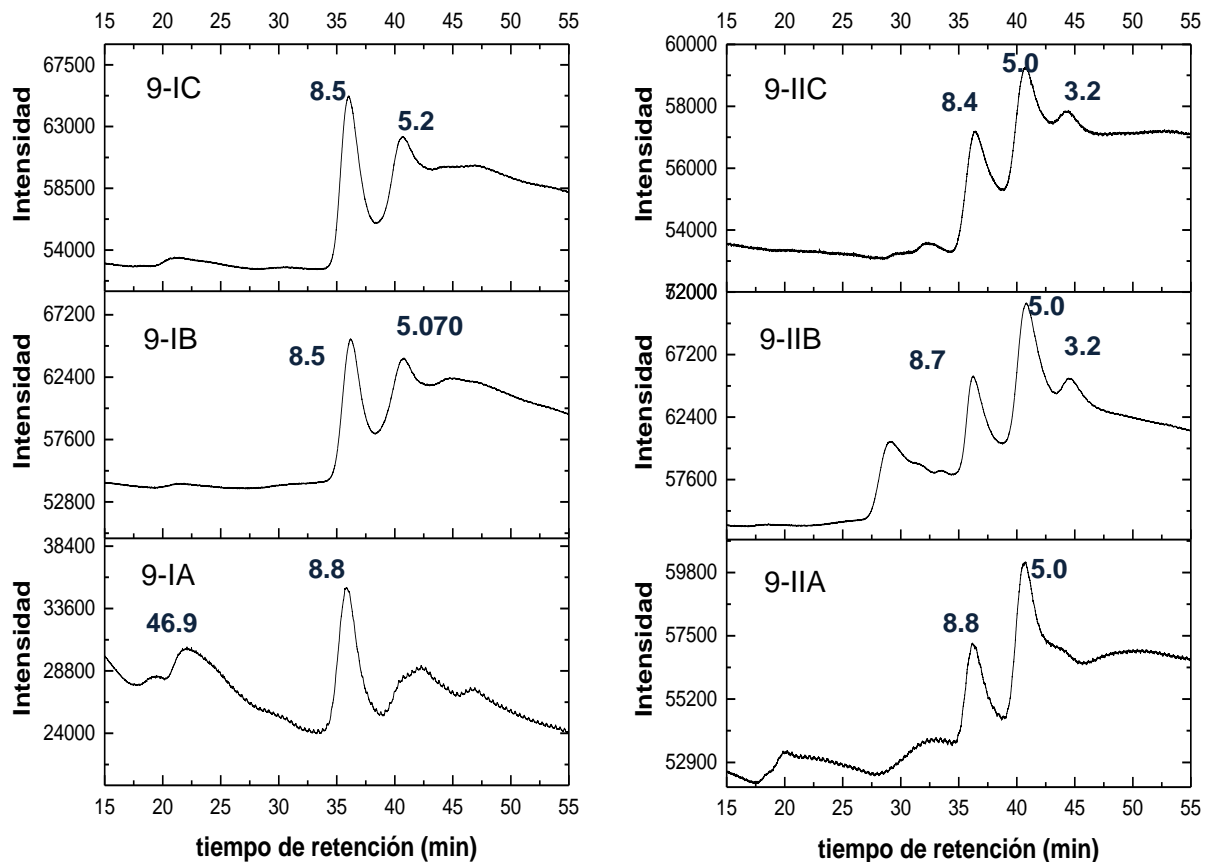


Figura 9. Separación de péptidos producidos por *S. thermophilus* 54-102 por HPLC en columna de exclusión de tamaño a 257 nm (serie 9-I) y 280 nm (serie 9-II). (A) Inicio de fermentación, (B) mitad de fermentación y (C) final de fermentación

De acuerdo a los cromatogramas obtenidos para la fermentación con ambos microorganismos (Fig.10-I y 10-II), se observa un aumento en la concentración aparente de los péptidos con residuos de aminoácidos aromáticos. Al inicio de la fermentación (Fig. 10-IA) se identificaron dos péptidos de menos de 10 kDa conteniendo Phe (8.8 y 5.0 kDa con $t_R= 35$ y 40 min, respectivamente) y aunque la concentración del péptido de 8.8 kDa disminuyó en la etapa intermedia de la fermentación (Fig. 10-IB) otro péptido de 9.4 kDa ($t_R=30$ min) apareció al final de la misma (Fig. 10-IC). Adicionalmente, la concentración aparente de los otros dos péptidos permaneció constante.

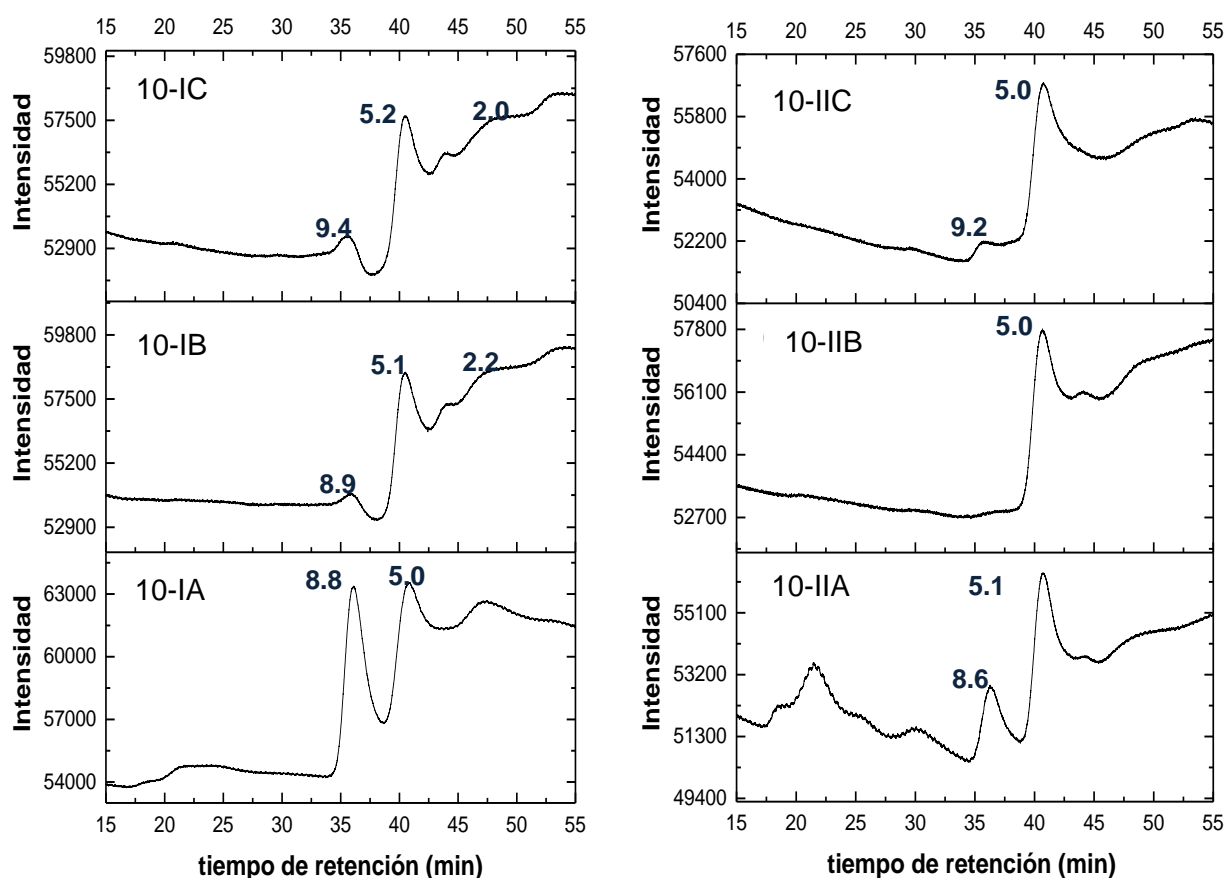


Figura 10. Separación de péptidos producidos por *L. rhamnosus* y *S. thermophilus* 54-102 por HPLC en columna de exclusión de tamaño, a 257 nm (serie 10-I) y 280 nm (serie 10-II). (A) Inicio de fermentación, (B) mitad de fermentación y (C) final de fermentación.

Por otro lado, al inicio de la fermentación, también se encontraron péptidos con peso molecular menor a 10 kDa, con residuos de Tyr y Trp (Fig. 10-IIA). Al final del proceso

hubo un incremento aparente en la concentración de la fracción de 5.0 kDa (Fig. 10-IIB). Igual que en el análisis a 257 kDa, algunas fracciones desaparecieron en la etapa intermedia de la fermentación (Fig. 10-IIB) mientras que otras, aparecieron al final, principalmente una fracción de 9.2 kDa (Fig. 10-IIC).

La fracción de 5.0 kDa ya se había observado durante el proceso de fermentación con *Streptococcus thermophilus*. De lo anterior se podría inferir que esta fracción se produjo por este microorganismo y además se acumuló durante la fermentación, independientemente de que se encontrara en un sistema simbiótico.

Durante el proceso fermentativo en un sistema mixto, el sistema proteolítico de *Lactobacillus rhamnosus* GG rompió la caseína para obtener aminoácidos esenciales para su metabolismo, liberando fracciones peptídicas de bajo peso molecular que *Streptococcus thermophilus* 54-102 introduce a la célula. Este comportamiento se ha descrito principalmente para *L. delbrueckii* sub. *bulgaricus* y *S. salivarius* sub. *thermophilus* durante la elaboración de yogurt (García-Garibay *et al.*, 1993). Por medio de la proteinasa PrtS, *S. thermophilus* desintegra la fracción peptídica, utilizando solo algunos aminoácidos esenciales para su crecimiento y sobrevivencia en el medio. Por otro lado, este microorganismo contiene peptidasas especiales como la PepS que al romper a los oligopéptidos libera residuos con aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos, principalmente Phe (Adda *et al.*, 1982; Dun y Lindsay, 1985; Lee y Desmazeaud, 1985).

5.5 Determinación de la actividad antihipertensiva

Al inicio de la fermentación con *Lactobacillus rhamnosus* GG (Fig. 11a) se determinó una inhibición de ECA de 46.9%. Dicha inhibición se incrementó a la mitad del proceso, ya que a las 21 horas de fermentación se obtuvo un porcentaje de 74.6% de inhibición. Sin embargo, a pesar de que se observó la acumulación de péptidos de bajo peso molecular, el porcentaje de inhibición disminuyó al final del proceso (59.9%).

Se sabe que al inicio de la fermentación *Lactobacillus rhamnosus* requiere aminoácidos aromáticos (Phe, Trp) esenciales para su crecimiento (Morishita *et al.*, 1999). Sin embargo, aparentemente, estas necesidades impiden la acumulación de péptidos con residuos de aminoácidos aromáticos, lo cual puede ocasionar una disminución de la inhibición de ECA.



Por el contrario, las fracciones peptídicas de la fermentación con *S. thermophilus* 54-102 presentaron un incremento de la inhibición de la ECA (80.4%) al final de la fermentación(Fig. 11b).

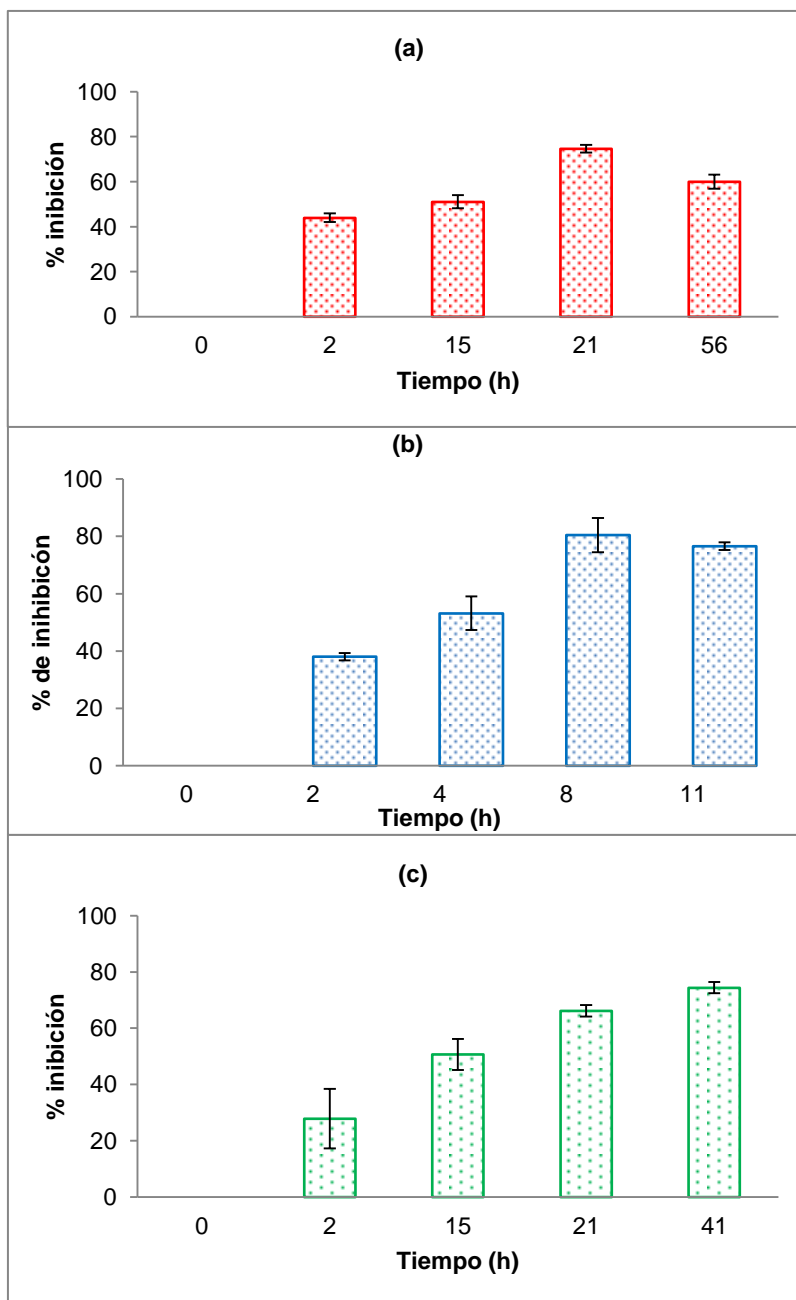


Figura 11. Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina con péptidos liberados por (a) *L. rhamnosus* GG, (b) *S. thermophilus* 54-102, (c) cultivo mixto.

El comportamiento observado en los sistemas fermentados con *S. thermophilus* tiene que ver con que sus requerimientos nutricionales son diferentes al de otras bacterias (Letort *et al.*, 2002) y poseen un sistema muy avanzado a manera de operón de producción de aminoácidos (leucina, isoleucina y valina) (Matsufuji *et al.*, 1994; Garault *et al.*, 2000). También se generan péptidos de bajo peso molecular, aunque durante el experimento se observó que los péptidos de bajo peso molecular se presentaron en menor proporción que en la fermentación con *Lactobacillus rhamnosus*. Además, la nula necesidad de péptidos con aminoácidos aromáticos por parte de *S. thermophilus* permite la acumulación de estos en el medio de fermentación (Akpemado y Bracquart, 1983; Letort y Julliard, 2001).

Al inicio de la fermentación en el cultivo mixto (Fig. 11c) se observó un 38% de inhibición, este porcentaje se incrementó de manera gradual, alcanzando 80% de inhibición a las 21 horas y permaneció sin cambio significativo hasta el final del proceso (41 horas). Este incremento pudo deberse a la presencia de una peptidasa intracelular específica de *Streptococcus thermophilus* que generara de manera constante péptidos conteniendo Phe (Fernández–Espla y Rul, 1999) puesto que se ha reportado que este microorganismo excreta al medio péptidos de dos y tres aminoácidos generados por la acción de dipeptidasas intracelulares (Rul y Monnet 1997; Fernández–Espla y Rul., 1999).

Este incremento en la actividad antihipertensiva es congruente con los resultados obtenidos durante el análisis por electroforesis, donde se encontró acumulación de péptidos de bajo peso molecular; así como con lo observado en el análisis por HPLC donde se determinó la presencia constante de péptidos con residuos de aminoácidos aromáticos. Se ha observado un incremento en la inhibición de ECA durante la fermentación de leche con BAL (Rokka *et al.*, 1997). Sin embargo, se sabe que la capacidad antihipertensiva de leches fermentadas donde se han utilizado BAL combinadas es mayor (Quirós *et al.*, 2007). Adicionalmente, debido a que *Streptococcus thermophilus* tiene la capacidad de liberar péptidos con capacidad antihipertensiva desde el inicio de la hidrólisis proteica (Cheung *et al.*, 2014), es probable que esta actividad no se pierda mientras esta bacteria se encuentre en combinación con otros microorganismos durante una fermentación láctica.

En el caso del cultivo mixto estudiado en la presente investigación, los microorganismos utilizados mostraron un crecimiento simbiótico tal y como se observó en la proteólisis. La liberación de péptidos por estos microorganismos expuso un comportamiento similar al observado durante la fermentación con *Streptococcus thermophilus*, sin embargo, de



acuerdo a los análisis por electroforesis, hay una mayor diversidad y concentración de péptidos en este sistema y estos residuos pudieran presentar otras actividades biológicas de importancia, que no se estudiaron en esta investigación.



6. CONCLUSIONES

La combinación de *L. rhamnosus* y *S. thermophilus* 54-102 en un sistema de fermentación láctea favorece la acidificación del medio en tiempos más cortos, comparado con los sistemas fermentados inoculados solo con *L. rhamnosus*. Así mismo, la utilización de un sistema mixto promueve una mayor actividad proteolítica favoreciendo una mayor producción de péptidos de bajo peso molecular.

El sistema de fermentación mixto *L. rhamnosus*/*S. thermophilus* 54-102, no produce efectos negativos en la producción de péptidos con fracciones conteniendo aminoácidos aromáticos. Es decir, no hay degradación de este tipo de péptidos en el medio una vez liberados.

La actividad antihipertensiva de las fracciones peptídicas obtenidas en este trabajo esta relacionada con la presencia de péptidos de bajo peso molecular así como con la presencia de aminoácidos aromáticos en dichas fracciones. Adicionalmente, utilizar un sistema mixto para la fermentación de la leche, aumenta la capacidad antihipertensiva de los péptidos derivados de la proteólisis.



7. ANEXOS

Preparación de medio de cultivo

Se tomaron 55g/L de agar MRS y se agregó 1.2% de agar bacteriológico, se diluyó en agua destilada y se agitó durante 5 minutos aproximadamente. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

8.2.1 Preparación de reactivos para técnica del TNBS

Amortiguador de fosfatos 0.2125 M a pH 8.2

Se pesaron 9.2525g de fosfato monobásico de potasio (K_2HPO_4) y se disolvieron en 250mL de agua. Se pesaron 1.4460g de fosfato dibásico de potasio (KH_2PO_4) y se diluyeron en 50mL. La solución de KH_2PO_4 se agregó a la solución de K_2HPO_4 hasta alcanzar un pH de 8.2.

Solución de TNBS al 0.10%

Se midieron 0.05mL de ácido trinitrobenzenosulfónico y se disolvieron en 25mL de la solución de buffer de fosfatos 0.2125 M a pH 8.2 .

8.3 Preparación de reactivos para electroforesis

Gel de separación

Se midieron 3.65mL de la solución stock de acrilamida 19:1 al 30%, se adicionaron 5.32mL de buffer tris 8.45 y 180μL de SDS 10%. Se Agitó lentamente a vacío durante 15 minutos para desgasificar la solución. Al final se agregaron 39.375μL persulfato de amonio pH 8.8 (preparado al instante) y 5.63μL de TEMED



Gel de concentración

Se midieron 0.32mL de la solución stock de acrilamida 19:1 al 30% y se agregaron: 3.68mL de buffer Tris pH 6.8 y 80µL de SDS 10 %. Se agitó lentamente a vacío durante 15 minutos para desgasificar la solución. Al final se agregaron 50µL de persulfato de amonio a pH 6.8 y 5µL de TEMED

Solución de Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%

Se pesó 0.1g de dodecil sulfato de sodio y se diluyó en 1mL de agua desionizada. La solución se almacenó en congelación.

Solución de persulfato de amonio al 10%

Se pesó 0.1 g de persulfato de amonio y se diluyó con 1mL de solución reguladora de Tris-HCl a pH 8.45 para el gel de separación y a pH de 6.8 para el gel de concentración.

Solución reguladora para la muestra

Se diluyeron 0.20mL de glicerol en 0.95mL de agua desionizada. La mezcla se agitó en vortex hasta su homogenización. Se adicionaron 0.25mL de solución reguladora Tris-HCl 0.05M a pH 6.8 y 0.10mL azul de bromofenol al 1%. Se siguió agitando hasta una coloración homogénea. Finalmente se agregaron 0.40mL de SDS al 10% y se agitó por 30 segundos más en vortex.

Solución reguladora de corrida Tris-glicina-SDS pH 8.3 (5X)

Se pesaron 7.5 g de Tris (hidroximetil) amino metano y 36g de glicina. Se diluyeron en 500mL de agua desionizada y se ajustó el pH a 8.3 con HCl 1N. Al final se adicionaron 2.5g de SDS homogenizando con un agitador magnético a baja velocidad para evitar la formación de espuma. La solución se almacenó en congelación.

Solución fijadora ácido acético (10%)-metanol (50%)

Se midieron y mezclaron 10mL de ácido acético glacial y 50mL de metanol, posteriormente se aforaron a 100mL con agua desionizada . La solución se almacenó en refrigeración.

Solución destiñidora ácido acético (7%)-metanol (10%)

Se midieron y mezclaron 7mL de ácido acético glacial y 10mL de metanol, posteriormente se aforaron a 100mL con agua desionizada. La solución se almacenó en refrigeración.



Solución de azul de Coomassie

Se mezclaron en 100mL de agua desionizada: 10mL de ácido acético glacial y 90mL de etanol al 96%. Cuando la mezcla quedo homogénea, se agregaron 0.5 g de azul de Coomassie, se agitó la solución hasta un color homogéneo. La solución se almacenó en refrigeración en un frasco ambar

8.4 Preparación de reactivos para determinación de actividad antihipertensiva

Solución amortiguadora de Borato 0.1 M, 0.3 M cloruro de sodio (NaCl) a pH de 8.3 (amortiguador del HHL 5mM).

Se pesaron 61.8 mg de ácido bórico (H_3BO_3) y 175.3mg de NaCl. Se diluyeron las sales en agua 10mL de agua destilada.

Solución para el sustrato HHL

Para preparar 2 mL de solución para el sustrato HHL, se pesaron 4.3mg de HHL y se diluyeron en 2mL de buffer de borato 0.1 M a pH de 8.3

Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 8.3

Se pesaron 0.136g de fosfato monobásico de potasio (K_2HPO_4) y se disolvieron en 10mL de agua. Se pesaron 0.174g de fosfato dibásico de potasio (KH_2PO_4) y se diluyeron en 10 mL. La solución de KH_2PO_4 se agregó a la solución de K_2HPO_4 hasta alcanzar un pH de 8.3.

Preparación de la enzima

Para tener 1U/mL de enzima, se resuspende toda la enzima de un frasco de ACE de riñón porcino (Sigma–Aldrich) en 1 mL de buffer de fosfatos 0.1M a pH de 8.3.



8. REFERENCIAS

Adda, J., Gripon, J. C. y Vassal, L. (1982). The chemistry of flavor and texture development in cheese. *Food chemistry*, (9), 115-129

Adler, N. J. (1979). Determination of degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agriculture and food chemistry*, (27), 1256-162

Aimutis, W. R. (2004). Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticancerogenesis. *Journal of Nutrition*, (134), S989-s995

Akpemado, K. M. y Bracquart, P. A. (1983). Uptake of branched-chain aminoacids by *Streptococcus thermophilus*. *Applied and environmental microbiology*,(45), 136-140

Araujo, M. C., Melo, R. L., Cesari, M. H., Juliano, L. y Carmona, A. K. (2000). Peptidase specificity characterization of C- and N- terminal catalytic sites of angiotensin-I-converting enzyme. *Biochemistry*, (39), 8519-8525

Baró, L., Jimenez, J., Martinez-Férez, A y Bouza, J. (2001). Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *ARS pharmaceutica*, (42), 35-145

Berry, D. (2000). Blood pressure reducing milk. *Dairy Foods*, (101), 12-25

Chang, O. K., roux, E., Awussi, A.A., Miclo, L., Jullin., Dary, A., Humbert, G. y Perrin, C. (2014). Use of a free form of the *Streptococcus thermophilus* cell envelope protease PrtS as a tool to produce bioactive peptides. *International Dairy Journal*, (38), 104-115

Chapot-Chartier, M. P., Rul, F., Nardi, M. y Gripon, J. C. (1994). Gene cloning and characterization of PepC, a Cysteine aminopeptidase from *Streptococcus thermophilus*, with sequence similarity to the eukaryotic bleomycin hydrolase. *European Journal of Biochemistry*, (224), 497-506

Cheung, H. S., Wang, F. L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F. y Cushman, D. W. (1980). Binding of peptides substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Journal of Biology and chemistry*, (25), 401-407

Courtin, P., Monnet, V. y Rul, F. (2002). Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus* / *Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, (148), 3413-3421



Cushman, D. W., Cheung, H. S., Sabo, E. F. y Ondetti, M. A. (1977). Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl aminoacids, *European Journal of Biochemistry*, (16) 5484-5491

De Wit, J. N. (1998). Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science*, (81), 597-608

Diaz, M., Decker, E. A. (2003), Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (52), 8208–8213

Donkor, O. N., Henkerson, A., Singh, T. K., Vasiljevic, T y Shah, N. P. (2007). ACE-inhibitory activity of probiotic yogurt. *International Dairy Journal*, (17), 1321-1331

Dreisbach, A. W., Sharma, S. y Claude, K. (2010). Hypertension. Nephrology: in *Hypertension and the Kidney*, (11)

Dunn, H. C. y Lindsay, R. C. (1985). Evaluation of the role of microbial Strecker-derived aromacomounds in unclean-type flavours of cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, (68), 2859-2874

Farrell, H. C., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Bluter, J.E., Creamer, L. K., Hicks, C. L., Hollar, C. M., Ng-Kwai-Hang, K. F. y Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows milk-sixth revision. *Journal of Dairy Science*, (87), 1641-1674

Fernandez-Espla, M. D. y Rul, F. (1999). PepS from *Streptococcus thermophilus* a new member of the aminopeptidases family of thermophilic bacteria. *European Journal of Biochemistry*, (263), 502-510

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

Fernandez, M. Hernandez, M. y Fox, P. (1997). Purification and characterization of prolidase from *Lactobacillus casei* subsp *casei* IFPL 731. *Applied and Environmental Microbiology*, (66), 4772-4778

Fitzgerald, R. J. y Murray, B. A. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, (59), 118-126



Fitzgerald, R. J. y Meisel, H. (2000). Milk protein-derived peptides and lactic fermentation. *International Journal of Nutrition*, (1), S33-S37

Fulier, R. (1989). Probiotics in man and animal. *Applied and Environmental Microbiology*, (66), 365-378

Garcia-Garibay, M. (1993). Productos lácteos en *Biotecnología Alimentaria*, (1^a.), Editorial Limusa, 162-191

Garault, P., Letort, C., Julliard, V. y Monnet, V. (2000). Branched-chain amino acid biosynthesis is essential for optimal growth of *Streptococcus thermophilus* in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, (66), 5128-5133

Gasson, M. J. y De Vos, W. M. (1994). The proteolytic system of lactic acid bacteria genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. *Academic y Professional an imprint of chapman*, 169-210

González, O. L. G., Jimenez, G. J., Cruz, G. A., Rodríguez, S. G., Gómez, R. L. y García, G. M. (2011). Liberación de péptidos bioactivos por bacterias lácticas en leches fermentadas comerciales. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, (10), 179-188

Guadix, A., Guadix, E. M., Páez-Dueñas, M. P., González-Tello, P. y Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*. (41), 79-89

Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y. y Takano, T. (1996). A placebo controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, (64), 767-771

Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W. y Chi, L. (2008). The antihypertensive effect of peptides. *A novel alternative to drugs peptides*, (29), 1062-1071

Juilliard, V., Dominique, L., Kunji, E., Konings, W., Gripon, J. C. y Richard, J. (1995). Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Applied and environmental Microbiology*, (208), 3024-3030

Kok, J. y De Vos W.M. (1994). The proteolytic system of lactic acid bacteria. *In Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria*. Blackie Academic & Professional, Glasgow, 169–210



- Korhonen, H., Pihlanto-lepälä, A., Rantamäki, P. y Tupasela, T. (1998). Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends in Food Science and Technology*, (9), 307-319
- Korhonen, H. y Pihlanto-Lepälä, A. (2006). Bioactive peptides, production and functionality. *International Dairy Journal*, (16), 945-960
- Korhonen, H. (2009). Milk- derived bioactive peptides: from science to applications. *Journal of functional Foods*, (1), 177-187
- Kumar, M., Path, V., Abul K., Abbas, Nelson, F. y Aster, J. (2009). Hypertensive vascular disease. *Elsevier* (978), 3121-4160
- Kunji, E. R. S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B. y Konings, W. N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* (70), 187-221
- Kunji, E. R. S., Mierau, I., Hagting, A., De Vries, C. J., Julliard, V., Haandrikman, A., J., Poolman, B. y Konings, W. N. (1995). Transport of α -casein derived peptides by the oligopeptide transport system is a crucial step in the proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *Journal of Biology and Chemistry*, (270), 1569-1574
- Law, J. y Haandrikman, A., J. (1997). Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria review article. *International Dairy Journal*, (7), 1-11
- Lee, K. D. y Desmazeaud, M., J. (1985). Utilization of aromatic aminoacids as nitrogen sources in *Brevibacterium linens*: an inducible aromatic aminoacid aminotransferase. *Archive of Microbiology*, (140), 331-337
- Leroy, F. y De Vuyst, L. (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Science Technology*, (15), 67-78
- Letort, C., Nardi, M., Garault, P., Monnet, V. y Julliard, V. (2002). Casein utilization by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, (68), 3162-1365
- Letort, C. y Julliard, V. (2001). Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Applied Microbiology*, (91), 1023-1029



Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky, L. y Darnell, J. (2005). 5ª Ed. Biología Celular y Molecular. Editorial Médica Panamericana. Purificación, detección y caracterización de las proteínas, 87.

Lomonte, B. (2009). Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en Inmunología General en Manual de Laboratorio, (13), 92-101

Maruyama, S., Mitachi, H., Tanaka, H., Tomisuka, N. y Susuki, H. (1987). Studies on active site and antihypertensive activity of angiotensin-I-converting enzyme-inhibitor derived from casein. *Journal Agricultural Biology and Chemistry*, (51), 1581-1586

Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomisuka, N. y Susuki, H. (1985). Angiotensin-i-converting enzyme-inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Journal Agricultural Biology and Chemistry*,(49), 1405-1409

Maruyama, S. y Susuki, H. (1982). A peptide inhibitor of angiotensin-I-converting enzyme in the triptic hydrolysate of casein. *Journal Agricultural Biology and Chemistry*, (46), 1393-1394

Maruyama, S., Miyoshi S., Osa, T. y Tanaka, H. (1992). Prolyl endopeptidase inhibitory activity of peptides in the repeated sequence of various proline rich proteins. *Journal Fermentation Bioengineering*, (74), 145-148

Matsui, T., Hayashi, A., Tamaya, K., Matsumoto, K., Kawasaki, T., Marukami, K. y Kimoto, K. (2003). Depression effect induced by dipeptide, Val-Tyr, in hypertensive transgenic mice is due, in part, to the suppression of human circulating renin-angiotensin system. *Clinical and Experimental pharmacology and physiology*, (30), 262-265

Matsufuji, H., Matsui, T., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M. y Osajima, Y. (1994). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolysate derived from sardinemuscle. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, (58), 2244-2245

Meisel, H. (1993). Casokinins as inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *Perspectives in infant nutrition. Medicinal chemistry*, (52), 153-159



- Meisel, H., Goepfert, A. y Günther, S. (1997). ACE inhibitory activities in milk products. *Milchwissenschaft*, (52), 307-311
- Mine, Y., Li-Chan, E. y Jiang, B. (2010). Bioactive proteins peptides as functional foods an nutraceuticals in Functional foods products with antihypertensive effects, (12), 170-171
- Moreira, M., Abraham, A. y De Antoni, G. (2000). Thechnological properties of milks fermented with termophilic lactic acid bacteria at suboptimal temperature. *Journal of Dairy Science*, (83), 395-400
- Morishita, T. y Deguchi, Y. (1999). *Lactobacillus casei strain Shirota* in Nutrition and metabolism in *Yakult Central Institute for Microbiological*. Tokio, Japón, 38-52
- Nollet, L. M. L. y Toldrá, F. (2013). Food Analysis by HPLC. Third edition. CRC Press. HPLC of Food Proteins. 97-100
- Parra, L., Casal, V. y Gómez, R. (2000). Contribution of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* IFPL-359 and *Lactobacillus casei* subsp *casei* IFPL-731 to the proteolysis of caprine curd slurries. *Journal of Food Science*, (65), 24-26
- Ortíz-Chao, P., Gómez-Ruiz, J. A., Rastall, R. A., mills, P., Cramer, R., Philanto, A., Korhonen, H. y Jauregui, P. (2009). Production of ovel ACE-inhibitory peptides from β -lactoglobulin usin protease N-amano. *International Dairy journal*, (19), 69-76
- Pearce, L. y Flint, S. (2002), *Streptococcus thermophilus*. *Encyclopedia of dairy Sciences*, (17), 33-41
- Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A. y Recio, I. (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Dairy Science*, (73), 894-899
- Ragajopal, S. N., Sandine, W. E. (1990). Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk. *Journal of Dairy Science*, (73), 894-899
- Santos R. A. S., Ferreira A. J., Verano-Braga, T. y Bader M. (2013). Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *Journal of Endocrinology*, (216), R1-R17



Rokka, T., Syväoja, E. y Tuominen, J. (1997). Release of bioactive by enzymatic proteolysis of *Lactobacillus* GG fermented UHT milk, *Milchwiissenschaft*, (66), 9

Rojas-Ronquillo, M. R., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruíz, L., Reyes-Grajeda, J. P., Jiménez-Guzmán, J. Y García-Garibay, M. (2012). Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei shirota*. *Food biotechnology*, (26), 1-8

Rojas-Ronquillo, M. R. (2009). Perfil de péptidos bioactivos durante la fermentación con *Lactobacillus casei* y *Streptococcus thermophilus*, (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa Edo. de México

Rul, F. y Monnet, V. (1997). Presence of additional peptidases in *Streptococcus thermophilus* CNRZ-302 compared to *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology*; (82), 695-704

Ryhänen, E., Pihlanto, A. y Pahkala, E. (2001). A new type of ripened, lowfat cheese with bioactive properties. *International Dairy Journal*, (11), 441-447

Schagger, H., Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfatepolyacrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, (166), 368-379

Shihata, A. y Shah, N. P. (2000). Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *International Dairy Journal Science*, (10), 401-408

Sierra, I., Gómez, R. S., Pérez, D., Morante, S. (2009). Análisis Instrumental. Netbiblo, España, 142-143.

Skeggs, L. T., Kahan, J. E. y Sumway, N. P. (1956). The preparation and function of the angiotensin-converting enzyme. *Journal of Experimental Medicine*, (103), 295-299

Smacchi, E. y Gobetti, M. (1998). Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, (22), 687–694



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

Somkuti, G. A. y Paul M. (2010). Degradation of milk-based bioactive peptides by yogurt fermentation bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, (49), 345-350

Takahashi, M. (1999). Morphology and structure for *Lactobacillus casei* strain *Shirota*. Microbiological Research. Tokio, Japon. Yakult Honsha, 23-30

Tjwantan, B., Poolman, B. y Konings, W. (1993). Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. Journal of Dairy Research, (60), 269-286

Walstra, P., Geurts, T. J., Normen, A., Jellema, A. y Van Boekel, M. (2001). Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos. Ed. Acribia, España, 39-50, 80-130

Walstra, P. y Jenness, R. (1987). Química y Física lactológica. Ed. Acribia, Zaragoza, España, 24-30, 90-100

Wang, Y. C., Yu, R. C., Chou, C. C. (2004), Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *International Journal of Food Microbiology*, (99), 209-217

Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T. (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science*, (77), 917-922



Comparación del perfil proteolítico durante la fermentación de leche por *Streptococcus thermophilus* 52-104 y *Lactobacillus rhamnosus* GG

J.L. Sebastian Nicolas^{1,*}, L.G. González Olivares^{2,+}, J. Añorve Morga³, A. Castañeda Ovando⁴, E. Contreras López⁵, J. Jaimez Ordaz, A.E. Cruz Guerrero⁶

¹ Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo/ Carr. Pachuca-Tulancingo km 4.5, Pachuca, Hgo., C.P. 42067, México/ jselisni_girlinlove80191@hotmail.com

² Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo/ Carr. Pachuca-Tulancingo km 4.5, Pachuca, Hgo., C.P. 42067, México, lgonzalez@uaeh.edu.mx

³ Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo/ Carr. Pachuca-Tulancingo km 4.5, Pachuca, Hgo., C.P. 42067, México/ amjavier54@hotmail.com

⁴ Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo/ Carr. Pachuca-Tulancingo km 4.5, Pachuca, Hgo., C.P. 42067, México/ aovando@uaeh.edu.mx

⁵ Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo/ Carr. Pachuca-Tulancingo km 4.5, Pachuca, Hgo., C.P. 42067, México/ elilopez@yahoo.com.mx

⁶ Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa./ México, D. F., México/ aecg@xanum.uam.edu

* Autor que presentará trabajo.

+ Autor a quien la correspondencia deba ser enviada; Tel.: (52)-(771)-712000 Ext. 2513; Centro de Investigaciones Químicas, Departamento de Biotecnología.

Área del Conocimiento: **Biotecnología alimentaria**

Resumen: La selección de los cultivos iniciadores, es el primer paso en el proceso de elaboración de productos lácteos fermentados. Estos cultivos iniciadores pueden contener alguna bacteria probiótica y generalmente están acompañados con otras que no lo son. En la última década se ha estudiado la producción de péptidos bioactivos generados durante la fermentación de leche. Esta producción de péptidos bioactivos está enmarcada por el trabajo proteolítico específico de cada bacterias lácticas. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad *Streptococcus thermophilus* 52-104, *Lactobacillus rhamnosus* GG y la simbiosis de los dos microorganismos en producir péptidos de bajo peso molecular con probable actividad bioactiva. Así

que se realizaron cinéticas de fermentación y se monitoreó la acidificación, los grupos amino libres por medio del método del ácido trinitrobenzeno sulfónico (TNBS) y la producción de péptidos por medio de electroforesis para péptidos (Tris-Tricine PAGE). Se observó que la fermentación con la simbiosis de microorganismos tuvo mayor formación de grupos amino libres que las fermentaciones unitarias y que a su vez la fermentación con el probiótico mostró mayor producción de estos grupos que la de *Streptococcus thermophilus* 52-104. Estos mismos resultados se encontraron durante el análisis por electroforesis donde además en la simbiosis, se lograron separar algunos péptidos de peso molecular menor a 1.6 kDa, los cuales no se observaron en los otros dos sistemas, elevando las expectativas de encontrar péptidos bioactivos.

Palabras Clave: Péptidos, bacterias lácticas, probióticos, sistema proteolítico

Abstract: The selection of starter cultures is the first step in the preparation of fermented dairy products. These starter cultures may contain a probiotic bacteria which usually are accompanied with others that are not probiotics. In the last decade it has been studied the production of bioactive peptides generated during the fermentation of milk. The production of bioactive peptides is framed by the work-specific proteolytic lactic acid bacteria. The aim of this study was to determine the capacity *Streptococcus thermophilus* 52-104, *Lactobacillus rhamnosus* GG and the symbiosis of the two microorganisms to produce low molecular weight peptides with bioactive activity. Fermentation were conducted and monitored until acidification. The free amino groups were studied by the method of trinitrobenzenesulfonic acid and production of peptides by electrophoresis for peptides (Tris-Tricine PAGE). A highest concentration of free amino groups was observed in symbiotic fermentation. The fermentation with probiotic showed more peptide concentration than the fermentation with *Streptococcus thermophilus* 52-104. These results were found during the electrophoresis analysis too, also in symbiosis results. There were some peptides with molecular weight of less than 1.6 kDa, which were not observed in the other two systems, raising expectations of finding bioactive peptides.

Key words: Peptide, lactic bacteria, probiotic, proteolytic system

1. Introducción

La leche es un alimento de alto valor nutricional que durante largo tiempo se ha considerado como una alimento completo por los constituyentes de la misma. Estudios recientes han demostrado que este alimento puede ser una fuente rica en compuestos con actividad biológica principalmente en productos fermentados (1). Durante la fermentación con bacterias lácticas, se liberan pequeñas moléculas constituidas por residuos de aminoácidos proporcionando actividad biológica para formar parte de una alternativa como coadyuvantes en el tratamiento de enfermedades causadas por diversos factores, estas moléculas con actividad biológica reciben el nombre de péptidos bioactivos que están constituidos por una secuencia de aminoácidos, codificados e identificados realizando funciones dentro del organismo no obstante, adquieren características como antimicrobianos, antitrombóticos, opioides, inmunoestimuladores y acarreadores de metales o en su defecto como antihipertensivos siendo estos los más estudiados (2). Los péptidos bioactivos se incluyen en el grupo de ingredientes funcionales de naturaleza proteica, que permiten la obtención de alimentos funcionales. La liberación de los péptidos bioactivos a partir de una secuencia proteica puede producirse por hidrólisis enzimática (3) además de los procesos fermentativos (4) o por la combinación de ambos, que tiene lugar bien durante el procesado de

alimentos o durante la digestión gastrointestinal (5). Dentro del grupo de los péptidos bioactivos, aquellos con actividad antihipertensiva han centrado el interés de los científicos y las industrias, debido al incremento de la mortalidad en los países industrializados por la hipertensión y/o por sus complicaciones renales, cardíacas o cerebrales. Los péptidos antihipertensivos son capaces de realizar una inhibición competitiva en la enzima convertidora de angiotensina (ECA) reduciendo la formación de angiotensina II y propiciado la degradación de bradiquinina en el ciclo de la renina angiotensina, disminuyendo así la vasoconstricción de las arterias y produciendo un efecto hipotensor; estos péptidos con actividad antihipertensiva tienen la característica de tener un bajo peso molecular los cuales se han aislado a partir de hidrolizados enzimáticos de las caseínas, durante el proceso de fermentación de leche, la capacidad proteolítica de las bacterias ácido lácticas juega un papel muy importante durante la fermentación, principalmente en el fraccionamiento de proteínas a péptidos y aminoácidos libres (6).

2. Materiales y métodos.

2.1 Preparación de los cultivos iniciadores

En este estudio se utilizaron las cepas *Streptococcus thermophilus* 54-102 y *Lactobacillus rhamnosus* GG. Las cepas fueron propagadas en caldo MRS incubando por 24 horas a 42°C. La cepa se propagó en un tubo de ensayo con 9 mL de leche al 10 % P/V pasteurizada. Se incubó por 24 horas a 42 °C. Posteriormente se inoculó 1 mL de la cepa propagada, en un matraz Erlenmeyer con 200 mL de leche al 10 % P/V previamente pasteurizada a 90 °C por 10 minutos en autoclave. Se incubó durante 24 horas a 42°C, y se realizó un conteo UFC para poder inocular a los matraces de fermentación con 1×10^6 UFC de cada cepa.

2.2 Fermentación

Los sistemas de fermentación se prepararon con 200 ml de leche al 10% con 2% de lactosa. Este sistema se pasteurizó antes de la inoculación a 90 °C por 10 minutos. Se inocularon 1×10^6 UFC de: *Streptococcus thermophilus* 54-102, *Lactobacillus rhamnosus* GG y ambos microorganismos, en sistemas separados. Se incubaron los sistemas a 42 °C y se tomaron muestras cada 2 horas para determinar el pH. La fermentación se detuvo aproximadamente en un pH de 4.5. Las muestras se centrifugaron 10 minutos a 6000 rpm a 4°C y se almacenaron en congelación.

2.3 Preparación de muestras

Se utilizaron muestras obtenidas durante la fermentación de *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Streptococcus thermophilus* 54-102 y del cultivo mixto, tomándose las muestras a las 12, 26, 28, 32, 36, 56 horas para *Lactobacillus rhamnosus* GG, 4, 6, 8, 10, 11 horas para *Streptococcus thermophilus* 54-102 y 15, 21, 27, 39, 41 horas para el cultivo mixto, centrifugándose en la microcentrífuga SORVALL fresco a 10 000 rpm por 10 minutos a 4°C. Estas muestras se utilizaron para las determinaciones de producción de péptidos por el método de TNBS y de electroforesis.

2.4 Determinación de la actividad proteolítica por el método de ácido trinitrobenzensulfónico (TNBS)

Se realizó una curva patrón con glicina. La solución estándar de glicina fue de una concentración 3mM con 1% de SDS. Se realizaron diferentes diluciones (0.05, 0.1, 0.15, 0.20 y 0.25 mg/mL). Se

colocaron en tubos de ensaye forrados con aluminio, 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.2125 M, pH 8.2. Se agregó 250 μ L de muestra a cada tubo y 250 μ L de agua desionizada para el blanco. A cada tubos se le agregó 1 mL de la solución de TNBS al 0.10%. Se incubaron las muestras durante una hora a una temperatura de 50 °C. Al final de este tiempo se paró la reacción con 4 mL de HCl 0.1 N. Se leyó espectrofotométricamente a 340 nm.

2.5 Separación de péptidos por electroforesis (SDS-Tricine-PAGE)

La electroforesis desnaturalizante para péptidos se realizó según (7). Se realizaron algunas modificaciones. Los geles se prepararon a partir de una solución patrón de acrilamida 19:1 de Bio-Rad con una T=5%. Los geles se tiñeron con Azul de Comassie 250 de Bio-Rad y se estudiaron por el analizador de imágenes Image-J para determinar el frente de referencia y los pesos moleculares.

3. Resultados

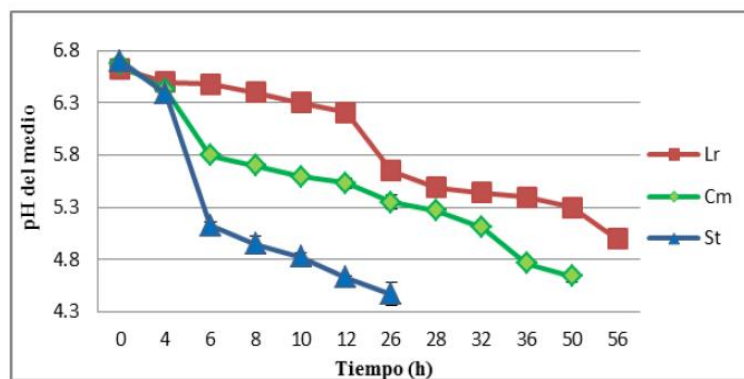


Fig. 1 Cinética de disminución de pH durante la fermentación *Lactobacillus rhamnosus* GG (Lr), *Streptococcus thermophilus* 54-102 (St), cultivo mixto (Cm).

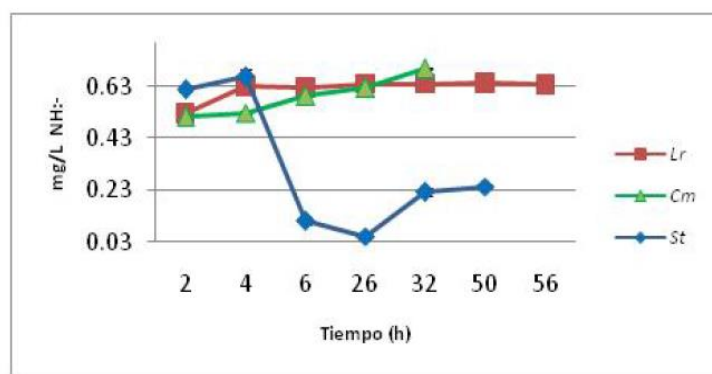


Fig. 2. Cinética de proteólisis durante fermentación de leche *Lactobacillus rhamnosus* GG (Lr), *Streptococcus thermophilus* 54-102 (St), cultivo mixto (Cm) 12, 26, 28, 32, 36, 56

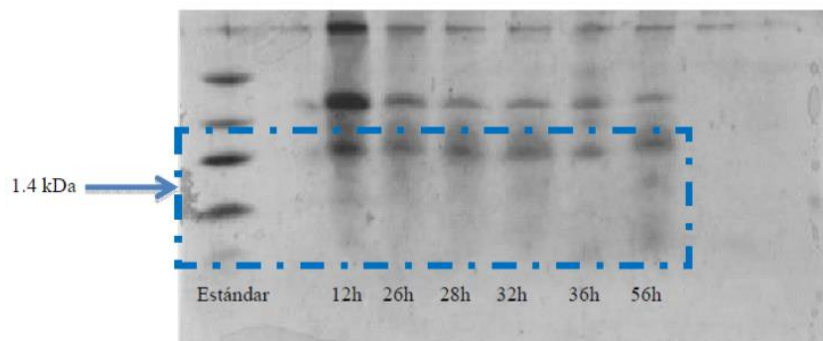


Fig. 3 Péptidos presentes en la fermentación con *Lactobacillus rhamnosus* GG

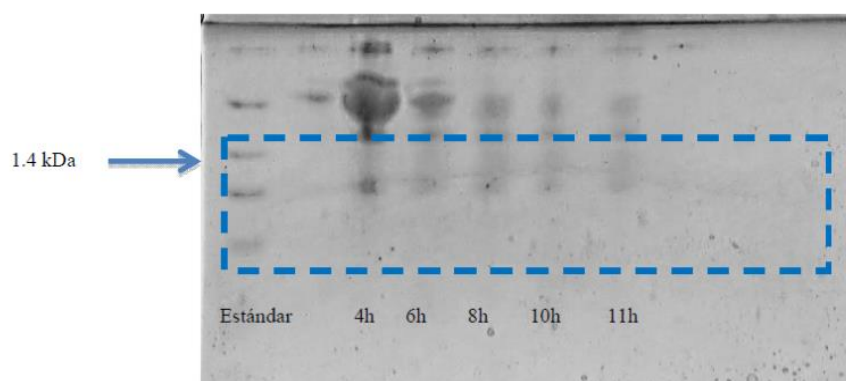


Fig. 4 Péptidos presentes en la fermentación con *Streptococcus thermophilus* 54-102.

4. Discusión

En los resultados obtenidos se puede observar que (Fig. 1), el pH disminuyó de manera constante en los tres sistemas hasta alcanzar un pH alrededor de 5 a 4.5. El sistema fermentado con *Lactobacillus rhamnosus* GG tardó más tiempo en alcanzar el pH para parar la fermentación (56 horas). Se ha observado que algunas cepas de *Lactobacillus rhamnosus* han mostrado dificultades para iniciar el proceso de fermentación. Esto es debido a la adaptación del microorganismo al medio (8). En el caso de la fermentación con *Streptococcus thermophilus* 54-102, se observó una tendencia de disminución de pH, la cual fue más rápida (11 horas) en comparación con la observada por *Lactobacillus rhamnosus* GG. Algunos autores han descrito que la disminución del pH durante el proceso de fermentación es debido a dos factores importantes, a la generación de biomasa y a la conversión de lactosa hacia ácido

láctico. Estos dos factores suelen ser determinantes en las diferencias observadas entre dos sistemas de fermentación con distintos microorganismos, ya que la adaptación de ellos es dependiente de la capacidad de utilización de fuente de carbono y de nitrógeno (9). En el sistema donde se inocularon los dos microorganismos, se observó una disminución hasta pH 5 alrededor de las 41 horas. Se decidió parar la fermentación ya que en pruebas previas de simbiosis, los sistemas no lograron bajar el pH hasta 4.5. Es sabido, que en sistemas simbióticos donde participa *Streptococcus thermophilus*, su crecimiento y adaptación es dependiente del metabolismo del otro microorganismo, ya que es necesaria la liberación de algunos aminoácidos esenciales para su crecimiento y con el consecuente retraso en la formación de biomasa y principalmente de la conversión de lactosa (10-11).

Se observaron diferencias entre las cinéticas de proteólisis (Fig. 2), entre la fermentación con *Streptococcus thermophilus* 54-102 y *Lactobacillus rhamnosus* GG. En el caso de *Streptococcus thermophilus*, se observó que al inicio se tenía una alta actividad proteolítica que al final disminuyó de acuerdo al análisis por TNBS. Se sabe que algunas especies de *Streptococcus thermophilus* tienen baja actividad proteolítica asociada a las proteasas de la pared celular, algunas investigaciones demuestran que una actividad proteolítica mayor se debe a peptidasas intracelulares que se liberan por lisis celular o por especificidad de estas por péptidos en el medio como glicina y metionina (12). En la fermentación con el cultivo mixto se observó un aumento en la concentración de grupos amino libres durante todo el proceso de fermentación. Esta mayor concentración se puede deber a dos factores importantes. El primero a los grupos expuestos debido a la desnaturalización parcial de las caseínas debido a la formación de ácido láctico bajando el pH a 4-4.5 (13-14), que es el valor donde se encuentra el punto isoeléctrico de este grupo de proteínas. El segundo a que durante la fermentación hay una cooperación simbiótica. Esta cooperación es debida a que el sistema proteolítico de estreptococo se ve favorecido por la presencia de residuos de metionina y glicina (12) y esto permite que el sistema mantenga la actividad proteolítica durante el desarrollo de los microorganismos en el medio, permitiendo la liberación de péptidos de peso molecular menor.

Al realizar la electroforesis para péptidos se encontraron bandas correspondientes a péptidos menores a 1.4 (Fig. 3) en la fermentación con *Lactobacillus rhamnosus*. Muchos de los péptidos con funciones bioactivas que se encuentran reportados en la bibliografía son menores a 10 kDa (15). En el análisis por Image-J, se observó una disminución en la concentración de las proteínas de peso molecular mayor a 14.4 kDa. Principalmente en BLG y ALA. Se ha observado que la actividad proteolítica de las bacterias lácticas continúa y se mantiene activa durante el proceso de fermentación (16). Varios autores han destacado que el origen de péptidos provenientes de proteínas del suero, es en general de mayor importancia en BLG debido a la concentración de prolina ya que las proteinasas y peptidasas del sistema proteolítico de bacterias lácticas son prolino-específicas (17-18). Desde el primer día de monitoreo se identificaron hasta 5 péptidos menores a 14.4 kDa. En el caso de la fermentación con *Streptococcus thermophilus* (Fig. 4), no se observó una concentración alta de péptidos menores a 1.4 kDa. Esto coincide con lo encontrado en el análisis de aminos libres totales por TNBS. Adicionalmente, se encontraron bandas menores a 14.4 kDa que fueron en aumento al final del monitoreo. Estas bandas pueden ser derivadas de la proteólisis primaria de caseínas durante la fermentación. Se sabe que el sustrato principal de las proteinasas asociadas a la pared celular de las bacterias ácido lácticas son las caseínas (12). Por otro lado la baja actividad proteolítica de estreptococos, hace que la producción de derivados con bajo peso molecular, sea en baja concentración. Sin embargo debido a que este tipo de microorganismos liberan al medio residuos con aminoácidos aromáticos, lo hacen un resultado muy importante, ya que se ha demostrado que este tipo de cadenas muestran actividad antihipertensiva (7).

Los resultados obtenidos mostraron que, la aparición de péptidos en el medio, obedece a un rompimiento de la estructura primaria de las proteínas, tanto de suero como de caseínas, partiendo del hecho de la caída en la concentración de las proteínas al mismo tiempo del aumento gradual, durante la fermentación, de péptidos de diferente peso molecular.

5. Conclusiones

La acumulación de péptidos de bajo peso molecular, sigue un patrón de cascada debido a la acción de proteinasas y peptidasas del sistema proteolítico de bacterias lácticas durante la fermentación. A partir del corte de proteínas, se generan péptidos de alto peso molecular, que sirven de sustrato para la formación de péptidos de peso intermedio para que a su vez estos últimos sean el sustrato para la formación de los péptidos de bajo peso molecular. La presencia de péptidos de bajo peso molecular en las fracciones péptidicas obtenidas, aumentan la probabilidad de encontrar péptidos con alguna actividad biológica. La utilización de *Streptococcus thermophilus* 54-102 y *Lactobacillus rhamnosus* GG, en un sistema de fermentación permite la acumulación de péptidos de bajo peso molecular en mayor concentración que cuando las bacterias son utilizadas solas.

Agradecimientos

Gracias al apoyo del Programa de Mejoramiento al Profesorado (PROMEP) se logra esta investigación

Referencias

- [1] Figueroa-González, I., Hernández-Sánchez, H., Rodríguez-Serrano G., Gómez-Ruiz L., García-Garibay M., Cruz-Guerrero A. (2010) Antimicrobial effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota co-cultivated with *Escherichia coli* UAM0403. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 9, 11-16.
- [2] Baró L, Jiménez J, Martínez-Férez A. y Bouza J. (2001) Péptidos y Proteínas de la Leche Con Propiedades Funcionales.
- [3] Hartmann, R. y Meisel, H. (2007). Food-derived with biological activity: from research to food application. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 163-169.
- [4] Quirós, A., Hernández-Ledezma, B., Ramos, M., Amigo, L. y Recio, I. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *J. Dairy Sci.* 88,3480-3487
- [5] Saito, T. (2008). Antihypertensive peptides derived from bovine casein and whey proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 606, 295-317.
- [6] Meisel H., Bockelmann W. (1999) Bioactive Peptides Encrypted In Milk Proteins: Proteolytic Activation And Thropho- Functional Properties: Insitute for ChemistryAnd Physics, Instute For Mycrobiology P.O Germany.
- [7] González-Olivares, L. G., Jiménez-Guzmán, J., Cruz-Guerrero, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M. (2011). Liberación de Péptidos Bioactivos por Bacterias Lácticas en Leches Fermentadas Comerciales. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 10:2, 179-188
- [8] Gasson, M. J. y Vos, W. M. de., 1994, Cap.4 : The proteolytic system of lactic acid bacteria, *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, editor Gasson, M. J.; Vos, W. M. de., ed. *Blackie Academic y Professional an Imprint of Chapman y Hall*. 169-210
- [9] FitzGerald R J and Meisel H (2003) Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In *Advanced Dairy Chemistry: Proteins*, Vol. 1A, pp 675–698. Fox P F and Mcsweeney P L H, eds. New York: Kluwer Academic / Plenum.

- [10] Pritchard, G. G. y Coolbear, T. (1993). The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 12, 179-203
- [11] Hols, P.; Hancy, F.; Fontaine, L.; Grossiord, B.; Prozzi, D.; Leblond_Bourget, N.; Decaris, B.; Bolotin, A.; Delorme, C.L.; Ehrlich, S.D.; Monnet, V.; Guedon, E.; Renault, P. y Kleerebezem, M. (2005). New insights in the molecular biology and Physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Review*. 29, 435-463
- [12] Hols, P.; Monnet, V.; Rul, F. y Maguin, E. (2008). Physiology of *Streptococcus thermophilus* during the late stage of milk fermentation with special regard to sulfur amino-acid metabolism. *Proteomics*. 8(20), 4273–4286
- [13] Donkor, O.N.; Henriksson, A.; Valjevic, T. y Shah, N.P. (2007). Effect of acidification on the activity of probiotics in yogurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 16, 1181-1189.
- [14] Donkor, O.N.; Henriksson, A.; Valjevic, T. y Shah, N.P. (2007). Survival and activity of selected probiotic organisms in set type yogurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 17, 657-665
- [15] Nighswonger, B.D., Brashears, M. M. y Gilliland, S. E. (1996). Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*. 79, 212-219.
- [16] Adhikari, K; Mustapha, A.; Grün, I.U. y Fernando, L. (2000). Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, 83, 1946-1951.
- [17] Ortiz-Chao, P., Gómez-Ruiz, J.A., Rastall, R.A., Mills, P., Cramer, R., Pihlanto, A., Korhonen, H. y Jauregui, P. (2009). Production of novel ACE inhibitory peptides from κ -lactoglobulin using protease N-amano. *International Dairy Journal*, 19, 69-76.
- [18] Marshall, V. W. y Tamime, A. Y. (1997). Starter cultures employed in the manufacture of biofermented milks. *International Journal of Dairy Technology*, 50, 35-41

La Universidad Autónoma de Guadalajara

a través de la
Facultad de Ciencias Químicas y de la
Escuela de Ciencias Biológico-Agropecuarias

otorga el presente

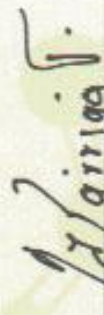
Reconocimiento

a Jessica Lizbeth Sebastián Nicolás, Luis Guillermo González Olivares, Javier Añorve Murga, Araceli Castañeda Ovando, Elizabeth Contreras Lopez, Judith Jaimez Ordaz, Alma Elizabeth Cruz Guerrero

por su trabajo titulado: *Comparación del perfil proteolítico durante la fermentación de leche por Streptococcus thermophilus 52-104 y Lactobacillus rhamnosus GG.*

4o. Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía
“Innovación para el Desarrollo Sustentable”, celebrado del 25 al 27 de septiembre de 2013.

Zapopan, Jalisco, México, septiembre de 2013.



Ing. José Antonio Barriga de la Torre
Decano de la Unidad Académica de
Diseño, Ciencia y Tecnología



Ing. Tomás Ornelas Salas
Director de la Facultad de Ciencias Químicas