



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

Determinación de la actividad antitrombótica de péptidos
generados por bacterias lácticas

TESIS

Que para obtener el título de:

Químico en Alimentos

PRESENTA

Emmanuel Pérez Escalante

DIRECTOR

Dr. Luis Guillermo González Olivares

CO-DIRECTOR

Dra. Eva María Santos López

Mineral de la Reforma, Hgo., septiembre de 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 el pasante de la Licenciatura de Química en Alimentos **Emmanuel Pérez Escalante**, quien presenta el trabajo de investigación **“Determinación de la actividad antitrombótica de péptidos generados por bacterias lácticas”**, 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	Dra. Eva María Santos López	
Tercer vocal	Dr. Gian Arturo Álvarez Romero	
Secretario	Dra. Judith Jaimez Ordaz	
Primer suplente	Dra. Silvia Nieto Velázquez	
Segundo suplente	M. en C. Juan Ramírez Godínez	

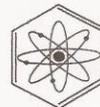
Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE
“Amor, Orden y Progreso”
Pachuca Hidalgo, 17 de septiembre 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 6502
galanv@uaeh.edu.mx





El trabajo recopilado en esta tesis ha sido realizado en el Laboratorio de Biotecnología I del Área Académica de Química, perteneciente al Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.



Los resultados de esta investigación fueron presentados en ponencia oral, en el XXXV Encuentro Nacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. llevado a cabo del 6 al 9 de mayo de 2014 en Puerto Vallarta, Jalisco; México.

AGRADECIMIENTOS...

A Dios, la virgen de Guadalupe y San Juditas Tadeo por brindarme la hermosa familia con la que cuento, porque gracias a la fe que les tengo he podido lograr todas mis metas.

A mis papás Beto y Lupita por darme la oportunidad de estudiar una licenciatura, por su confianza, por creer en mí, por su preocupación, por sus desvelos, por siempre estar en los momentos difíciles, pero sobre todo por el amor que recibo cada día de mi vida. Saben que son mi inspiración, mi modelo a seguir y en gran medida la razón por la que escogí estudiar esta carrera y realizar esta investigación. Los amo!!!

A mis hermanos Toñín y Made por su apoyo incondicional, por ser como mis segundos padres, por consentirme, por siempre estar al pendiente de mí, por su ejemplo como personas y profesionistas, pero sobre todo por su amor. Los adoro y espero que la bonita hermandad que tenemos dure para siempre!!! Ahhh por cierto también debo agradecerle a ti Made por darme la oportunidad de ser tío de dos bellos angelitos llamados Abril y Leonardo a quienes quiero muchísimo!!!

A esas personas que ya no están conmigo físicamente pero que fueron fundamentales para formar a la persona que soy ahora, a ellos que siempre me impulsaron a ser una mejor persona, un mejor estudiante, pero sobre todo un mejor hijo. A mi mamá Ofe, mi papá Memo y mi abuelita Gloria, a ustedes debo en gran medida este éxito. Siempre los llevaré en mi corazón.

Al Dr. Luis por darme la oportunidad de realizar esta investigación que tanto me apasionó y me seguirá apasionando, por su dedicación hacia mi persona, por estar al pendiente durante la elaboración de esta tesis, por sus conocimientos, pero sobre todo por sus consejos que fueron importantes para tomar ciertas decisiones.

A la Dra. Elizabeth por ser una gran persona, por esas pláticas en la coordinación, por sus consejos, pero sobre todo, por brindarme siempre su apoyo, no solo académico sino inclusive personal.

Al Dr. Añorve por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio, por las pláticas de fútbol que hacían menos tediosas las horas en el mismo, por compartir sus experiencias tanto profesionales como personales.

A mis sinodales: la Dra. Judith, la Dra. Eva, la Dra. Silvia, al Dr. Giann y a el M.Q. Juan por su opinión acerca del trabajo, por las observaciones para que esta tesis fuera mejor, pero sobre todo por sus conocimientos en el aula y por ser unas excelentes personas.

A mis amigos: Isai, Francisco, Carlos, Fidel, Marlenne, Olga, Estefanía, Oscar, Julio, Paco, Martín por hacer la carrera más divertida, por soportar mi carácter, por los viajes, por compartir conmigo cinco años de mi vida en los que la pase muy bien con su compañía, pero sobre todo por brindarme su apoyo y su amistad que valoro demasiado.

A las chicas del laboratorio de biotecnología: Jessica, Xochitl y Zaira, por su paciencia cuando me enseñaban una técnica, por su compañía en el laboratorio y por su apoyo para la realización del trabajo.

Quizás esta palabra no sea suficiente para retribuir lo que todos ustedes hicieron por mí, pero de todo corazón les digo:

GRACIAS!!!!!!!!!!

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Proteínas de la leche.....	3
2.1.1 Clasificación y características de las caseínas.....	5
2.1.2 Clasificación y características de las proteínas del suero.....	6
2.2. Leches fermentadas.....	7
2.2.1. Mecanismo proteolítico de las bacterias ácido lácticas durante la fermentación de leche.....	9
2.3. Péptidos bioactivos.....	11
2.4. Definición, características y mecanismo patológico de la trombosis	13
2.4.1 Características y mecanismo de acción de los péptidos antitrombóticos derivados de leche.....	17
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 General.....	19
3.2 Específicos	19
4. METODOLOGÍA.....	20
4.1. Obtención de BAL utilizadas para los sistemas de fermentación	20
4.1.1 Aislamiento de <i>Lactobacillus johnsonii</i> a partir de un producto lácteo fermentado comercial.....	20
4.1.2. Acondicionamiento, propagación y cultivo madre de BAL	20
4.2. Fermentación de leche con <i>Lactobacillus casei</i> Shirota y <i>Lactobacillus johnsonii</i>.....	21
4.3. Determinación de grupos amino libres mediante el método del ácido Trinitrobencensulfónico (TNBS).....	22
4.4. Determinación del contenido de nitrógeno proteico en muestras obtenidas a partir de la fermentación láctica.....	23
4.5. Separación de péptidos por electroforesis en gel de poliacrilamida Tris-Tricina SDS-PAGE.....	23
4.5.1. Preparación de muestras.....	24
4.5.2. Procedimiento.....	24
4.6. Ensayo enzimático de inhibición de trombina.	26
4.7. Análisis Estadístico.....	27
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	28

5.1. Fermentación de leche.....	28
5.2. Determinación de grupos amino libres.....	30
5.3. Separación de péptidos por electroforesis en gel de poliacrilamida Tris-Tricina SDS-PAGE.....	33
5.4. Ensayos enzimáticos de inhibición de la trombina	36
6. <i>CONCLUSIONES</i>	40
7. <i>PERSPECTIVAS</i>	41
8. <i>APÉNDICES</i>	42
8.1. Preparación de soluciones.	42
8.2. Curvas de Calibración.....	44
9. <i>REFERENCIAS</i>	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características más importantes de las proteínas de la leche:.....	5
Tabla 2: Principales péptidos bioactivos derivados de la leche.....	13
Tabla 3: Factores que promueven eventos trombóticos	15
Tabla 4: Cambios en el pH durante el periodo de fermentación por <i>Lactobacillus casei</i> Shirota y <i>Lactobacillus johnsonii</i>	28
Tabla 5: Proteólisis producida durante la fermentación por <i>Lactobacillus casei</i> Shirota y <i>Lactobacillus johnsonii</i>	31
Tabla 6: Pesos Moleculares de los péptidos generados durante la fermentación en leche por las BAL utilizadas.	35
Tabla 7: Pesos moleculares de los péptidos utilizados como estándar.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Cascada de la coagulación	16
Figura 2: Relación de cambios de pH con la curva de crecimiento microbiano en una fermentación de leche con <i>Lactobacillus casei</i> Shirota y <i>Lactobacillus johnsonii</i>	29
Figura 3: Separación de péptidos por electroforesis Tris-Tricina-SDS-PAGE producidos a partir de la fermentación realizada por <i>Lactobacillus casei</i> Shirota (I) a las 4 (A), 10 (B), 26 (C), 30 (D) y 33 (E) horas; y por <i>Lactobacillus johnsonii</i> (II) a las 10 (A), 22 (B), 24 (C) y 26 (D) horas.....	34
Figura 4: Efecto inhibitorio sobre la trombina de los péptidos generados por <i>Lactobacillus casei</i> Shirota (I) y <i>Lactobacillus johnsonii</i> (II) a distintos tiempos de fermentación.....	37
Figura 5: Curva de calibración de glicina para el cálculo de grupos amino libres.	44
Figura 6: Curva de calibración de seroalbúmina bovina para el cálculo de concentración de nitrógeno proteico en las muestras obtenidas de la fermentación láctica.....	45
Figura 7: Curva de calibración generada a partir de la electroforesis Tris-Tricina-SDS-PAGE de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota	46
Figura 8: Curva de calibración generada a partir de la electroforesis Tris-Tricina-SDS-PAGE de <i>Lactobacillus johnsonii</i>	46

RESUMEN

Durante los últimos años la investigación sobre péptidos bioactivos y en especial, los estudios sobre su efecto antitrombótico, se ha incrementado. Esto debido a que la trombosis es una patología con una mayor incidencia en la última década. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antitrombótica de péptidos liberados mediante fermentación láctica, medida como el grado de inhibición sobre la trombina, enzima encargada de la conversión de fibrinógeno en fibrina. Se probaron dos cepas de bacterias lácticas distintas (*Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus johnsonii*). Se realizó el seguimiento de fermentaciones en leche en función del descenso de pH. Donde se asignó como punto final de fermentación un pH de 4.5. El perfil proteolítico se estudió por medio de las técnicas del ácido trinitrobenzensulfónico (TNBS) y electroforesis en gel de poliacrilamida (Tris-Tricina-SDS-PAGE). Los resultados mostraron que la fase de adaptación de *Lactobacillus casei* Shirota fue mayor que la de *Lactobacillus johnsonii*. La proteólisis de *Lactobacillus casei* Shirota exhibió una mayor concentración de grupos amino libres comparada con *Lactobacillus johnsonii*. Adicionalmente, en la separación por electroforesis, se encontraron péptidos de peso molecular menor a 1.4 kDa durante toda la fermentación en ambos sistemas, siendo en la fermentación con *Lactobacillus casei* Shirota donde se observaron los de peso molecular más bajo. La inhibición de la trombina fue de 31% a las 10 horas de fermentación para *Lactobacillus johnsonii*, disminuyendo significativamente al final del proceso. En el caso de *Lactobacillus casei* Shirota, la mayor inhibición se obtuvo a las 26 horas (20% de inhibición). Los resultados mostraron que no existió relación aparente entre la acumulación de péptidos de bajo peso molecular con la actividad antitrombótica.

1. INTRODUCCIÓN

A finales del siglo XX comenzó el estudio sobre fracciones proteicas con actividad biológica en distintos alimentos, tales como: huevo, carne, pescado, soya y leche. Las fracciones que conferían beneficios fisiológicos al ser humano se denominaron “péptidos bioactivos”. Se encontró que los péptidos de leche, encriptados en la estructura primaria de las proteínas, ofrecían la mayor diversidad de características funcionales (Hartmann y Meisel, 2007; Möller, Scholz, Roos y Schrezenmeir, 2008).

Una de estas características funcionales es la actividad antitrombótica, la cual sigue tres patrones: inhibición de la agregación plaquetaria, inhibición de la acción de la trombina y actividad fibrinolítica (Topol, 2004; Kumar, 2005). Las fracciones antitrombóticas pueden ser obtenidas mediante dos procesos distintos, el primero de ellos comprende el uso de enzimas digestivas como pepsina o tripsina, mientras que el segundo consiste en la utilización de proteasas intrínsecas de las bacterias lácticas durante la fermentación de leche (Korhonen y Pihlanto, 2006). Este último proceso de obtención, ha sido el de mayor investigación en los últimos años, debido a que con él, se obtiene mayor diversidad de fracciones peptídicas con potencial bioactivo, gracias al sistema proteolítico de este tipo de bacterias (Savijoki, Ingmer y Varmanen, 2006). Algunos péptidos con dicha actividad se derivan de la proteína láctea κ -caseína. Estos péptidos antitrombóticos han sido llamados casoplatelinas, los cuales se encuentran encriptados en las fracciones del aminoácido 106 al aminoácido 116 y del 106 al 110, presentando inhibición de la agregación plaquetaria e inhibición competitiva sobre la trombina, respectivamente. (Hartmann *et al.*, 2007; Iwaniak y Minkiewicz, 2007). Estas dos características, posibilitan su inclusión como tratamiento de la trombosis, patología con un alta incidencia en la población mexicana y que es una de las principales causas de mortalidad en el país (Parra-Ortega, Estrada-Gómez y Ruíz Argüelles, 2007).

Las fracciones antitrombóticas derivadas de leche, actúan sobre la inhibición de la trombina. De esta forma se impide la conversión del fibrinógeno humano en fibrina, la cual es la responsable de la unión de plaquetas en la formación de trombos, impidiendo la circulación normal del torrente sanguíneo e incrementando la presión de la pared vascular (Kumar, 2005; Fernández-Travieso, 2009).

El objetivo de esta investigación fue determinar la capacidad antitrombótica de fracciones peptídicas liberadas durante la fermentación de leche con *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus johnsonii*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Proteínas de la leche

La leche está compuesta por 95% de nitrógeno proveniente de proteínas y el restante 5% de compuestos no proteicos, como bases nitrogenadas. Cuenta con una concentración promedio de proteína de 32 g/L, la cual es posible dividir en dos categorías (Alais, 1985):

Caseínas: Fosfoproteínas que precipitan cuando la leche es sometida a condiciones de pH 4.6 y temperatura de 20°C. Es la parte predominante de este sistema coloidal, abarcando un 79.5% del contenido total de proteínas. En esta categoría se agrupan las tres subunidades de caseína como lo son la α , β , y κ , las cuales son capaces de formar polímeros llamados micelas, gracias a la diversidad de grupos ionizables y cadenas de carácter hidrófobo e hidrófilo que presentan (Alais, 1985; Gösta, 1996).

La formación de micelas se lleva a cabo mediante la interacción del fosfato cálcico presente en la esterificación de los tres tipos de caseínas y las partes hidrofóbicas de las submicelas. Estas submicelas son formadas a partir del arreglo globular compuesto por las sales de calcio de la α y β -caseína, que adquieren solubilidad en el medio debido al grupo carbohidrato con alta carga negativa presente en la κ -caseína. Su tamaño es dependiente del contenido de iones calcio presente en la misma, sin embargo, una micela promedio puede contener alrededor de 400-500 submicelas y llegar a medir 0.4 μm (Alais, 1985; Gösta, 1996).

Como se mencionó anteriormente, la característica más sobresaliente de este tipo de proteínas es su capacidad de precipitar. Existen dos métodos para precipitar a las caseínas: el primero de ellos mediante la acción de un ácido, provocando la disolución del fosfato cálcico coloidal como iones calcio, pudiendo penetrar en la micela y formar interacciones cálcicas hidrófobas fuertemente unidas, además de tener un pH en el medio cercano al punto isoelectrico de las especies de caseína presentes; originando un aumento de tamaño de las micelas por agregación y una expulsión de agua presente para finalmente llegar a la formación de un coágulo más o menos denso (McKenzie, 1971; Gösta, 1996).

El segundo método consiste en la adición de enzimas proteolíticas (quimosina y pepsina) que escinden sobre el enlace aminoacídico 105(fenilalanina)-106(metionina) de la κ -caseína, desdoblándola en dos partes. La primera de ellas conocida como glicomacropéptido, la cual abarca la secuencia 106-148 de esta caseína, con características polares, permitiendo así su solubilidad en el suero lácteo; mientras que la segunda parte conocida como para κ -caseína está compuesta por los fragmentos 1-105, insolubles y que se unen a la α y β -caseína para formar un coágulo de caseína (McKenzie, 1971; Gösta, 1996).

Proteínas del suero: Proteínas que permanecen en solución en el suero lácteo una vez que se han hecho precipitar las caseínas. Constituyen alrededor del 19.3% de la proteína total.

Este tipo de proteínas se caracterizan por tener un alto valor nutritivo, debido a que su composición aminoacídica se acerca bastante a la considerada como biológicamente óptima, ya que cuentan con aminoácidos azufrados como la cisteína y la metionina. Para su aislamiento es necesario precipitarlas mediante calor, polielectrolitos y ajustando el pH en el punto isoeléctrico específico para cada una de ellas (Walstra y Jenness, 1987; Gösta, 1996).

Otra característica importante es su capacidad de formar complejos con caseínas cuando son desnaturalizadas por calor, ocasionando una disminución en el rendimiento de la fabricación de quesos, debido a que la caseína es atacada en menor proporción por las proteinasas, además de ligar menos calcio (Alais, 1985; Gösta, 1996). En la tabla 1 se pueden observar las principales características fisicoquímicas de las proteínas de la leche

Tabla 1: Características más importantes de las proteínas de la leche. Tomado de: Chairman et al., 1984 y Walstra et al., 1987.

Característica	Proteína						
	α_{s1} -CN	α_{s2} -CN	β -CN	κ -CN	α -LA	β -LG	SAB
Peso Molecular (KDa)	23.614	25.230	23.983	19.023	14.176	18.363	66.267
No. de aminoácidos	199	207	209	169	123	162	582
Aminoácidos principales.	E, P y L	E, K y Q	P, L y Q	P, A y Q	L, K y N	L, E, y K	L, K y Q
Grupos fosfato	8	11	5	1	0	0	0
Punto isoelectrico	4.4-4.8	4.2-4.6	4.8-5.1	5.5-5.8	4.2-4.5	5.1	4.7-4.9

CN: Caseína. LA: Lactoalbúmina. LG: Lactoglobulina. SAB: Seroalbúmina bovina.

2.1.1 Clasificación y características de las caseínas.

Los subgrupos que componen a las caseínas se describen a continuación:

α_{s1} -caseína: La cadena polipeptídica está compuesta por dos regiones con predominio apolar (restos 1-44 y 90-199) y una de carácter polar muy cargada (45-89). Siete de sus ocho grupos fosfato se encuentran en el segmento hidrofílico, mientras que las prolinas, uno de los aminoácidos principales de esta caseína se distribuye a lo largo de la cadena hidrofóbica, por lo que se le considera como una estructura flexible capaz de ligar ocho moles de calcio por mol de caseína, con la finalidad de auto-asociarse; teniendo una sensibilidad para precipitar a bajas concentraciones de este ión (7mM). Otros factores que influyen en la asociación de la α_{s1} - caseína son el pH y la fuerza iónica, cuyos valores óptimos son de 7 y de 0.01 respectivamente. Sin embargo, es relativamente independiente de la temperatura. (Chairman *et al.*, 1984; Walstra *et al.*, 1987).

α_{s2} -caseína: Se encuentra constituida por una estructura dipolar muy marcada, ya que la región con cargas negativas se concentra en la parte N-terminal, mientras que la región con carga positiva se centraliza en la parte C-terminal de la cadena polipeptídica. Es más

sensible a la precipitación con el ión calcio propio de la leche, que la caseína α_{s2} , pero tiene la propiedad de ligar más fuerte a este ión. De hecho su asociación puede llevarse a cabo sin presencia de Ca^{2+} y es equilibrada en cuanto aumenta la concentración proteica originando polímeros de tamaño uniforme (Chairman *et al.*, 1984; Walstra *et al.*, 1987).

β -caseína: Es considerada como la caseína más hidrofóbica, puesto que su estructura está formada por una cabeza cargada negativamente en la región N-terminal, seguida de una cola con carácter apolar, por lo que es comparada con la estructura de los detergentes aniónicos.

Tiene una marcada dependencia de la temperatura para su asociación tanto en ausencia o presencia de Ca^{2+} , mientras que a temperatura ambiente es capaz de formar polímeros de hasta 24 unidades, a 4°C se encuentra como un solo monómero. Otro efecto que presenta cuando la temperatura es reducida al punto de congelación es que comienza su disociación y el calcio ligado a su estructura empieza a ser expulsado lo que facilita su hidrólisis (Chairman *et al.*, 1984; Walstra *et al.*, 1987).

κ -caseína: Es la caseína principal presente en la leche, formada por una mezcla de polímeros unidos por enlaces disulfuro intermoleculares. Alrededor de un 30% de las moléculas de caseína carecen de un grupo carbohidrato, sin embargo en el resto de su estructura, cuentan con un número variable de ácido N-acetil-neuramínico, unido a glicosil-oligómeros, que se encuentran unidos a su vez a la treonina en la ubicación 133, en la región N-terminal de la misma.

Debido a su alta solubilidad en un amplio margen de concentraciones de Ca^{2+} , la κ - caseína es diferente a las demás proteínas fosfatadas, ya que sólo es capaz de ligar 2 moles de Ca^{2+} por mol de proteína (Chairman *et al.*, 1984; Walstra *et al.*, 1987).

2.1.2 Clasificación y características de las proteínas del suero

Como se mencionó anteriormente son proteínas que se encuentran en el sobrenadante al ser precipitadas las caseínas, la mayoría son globulares y son desnaturizadas mediante la acción del calor. Son clasificadas de la siguiente manera:

α -lactoalbúmina: Está presente en la leche de todos los mamíferos, teniéndose dos variantes denominadas A y B que difieren en la posición 10 con el aminoácido glutamina (Gln) y arginina (Arg) respectivamente. Su secuencia es parecida a la de lisozima conteniendo en la misma posición enlaces disulfuro. Su actividad biológica principal consiste en interaccionar junto con la galactosiltransferasa para promover la transferencia de galactosa proveniente de la UDP-galactosa a la fructosa para formar lactosa (Alais, 1985; Walstra *et al.*, 1987).

β -lactoglobulina: Es la proteína más abundante en el suero lácteo bovino, conformada por un dímero, el cual presenta una estructura de α - hélice en las posiciones de los aminoácidos del 21 al 37, del 51 al 63, del 127 al 143 y del 154 al 159; mientras que la estructura lámina β recorre las posiciones de los aminoácidos del 2 al 19, del 39 al 43, del 76 al 88, del 91 al 99 y del 101 al 107. Contiene cinco radicales de cisteína por mol, siendo cuatro los implicados en enlaces disulfuro, mientras que el grupo tiol libre puede reaccionar cuando la leche es calentada por encima de los 60°C, creando enlaces sulfuro con la κ - caseína, α -lactoalbúmina e inclusive con la β -lactoglobulina misma, además de crear un sabor a cocido (Alais, 1985; Walstra *et al.*, 1987).

Albúmina sérica bovina: Es uno de los componentes mayores del suero sanguíneo, consiste en una cadena polipeptídica de 582 aminoácidos, posee 17 enlaces disulfuro y un tiol libre, lo que le brinda su estructura multicruzada. Su función principal es la de transportar ácidos grasos que se unen a ella (Alais, 1985; Walstra *et al.*, 1987).

2.2. Leches fermentadas

Las leches fermentadas son productos preparados con leche, a los cuáles después del proceso de pasteurización se le cultivan BAL como iniciadores del proceso fermentativo, obteniéndose texturas y sabores característicos de estos productos (Montero-Marín, Limia-Sánchez, Franco-Vargas y Belmonte- Cortés, 2006).

El *Codex Alimentarius* las define como un producto lácteo obtenido a través de la fermentación con el uso de cultivos iniciadores específicos, que conlleva a una reducción de pH con o sin precipitación isoeléctrica. Los microorganismos utilizados deben ser

viables, activos y abundantes en el producto hasta la fecha de caducidad (CODEX-STAN 243-2003).

Las características de los productos lácteos fermentados son similares a la leche utilizada para su fabricación, difieren solamente en los ingredientes adicionados y la sensación ácida producida por la fermentación, sin embargo, debido al proceso a la que es sometida se obtienen beneficios tales como un aumento en la asimilación de proteínas, lactosa, calcio y la posibilidad de incorporar en éstos, distintos probióticos que permiten ofrecer diversos beneficios a la salud del organismo humano, lo que ha llevado a considerar a las leches fermentadas como alimentos funcionales (Montero *et al*, 2006).

Este tipo de productos son el origen del desarrollo y las necesidades nutricionales que presentan las bacterias ácido lácticas (BAL) al ser introducidas como cultivo iniciador en leche, ya que este tipo de microorganismos no cuentan con la posibilidad de obtención de energía a partir de una ruta anaplerótica o mediante el sistema de citocromo, por lo que recurren a la fermentación como su único medio de sobrevivencia (Law, 1997; Tamime y Robinson, 2000).

La fermentación láctica es clasificada en dos tipos de acuerdo al tipo de producto final obtenido; la primera de ellas se conoce como fermentación homoláctica y su ruta metabólica se describe enseguida:

El primer paso de esta vía es el transporte de la lactosa al interior de la célula donde es fosforilada, a través del sistema PEP:PTS conformado por fosfoenolpiruvato, fosfotransferasas y un conjunto de cuatro enzimas (II, III, I y HPr). Una vez dentro, la lactosa-6-fosfato es hidrolizada por la β -fosfogalactosidasa, desdoblándola en galactosa y glucosa, que son catabolizadas la primera vía Tagatosa y la segunda Emden-Mayerhof-Parnas, sin embargo en ambos casos los dos monosacáridos son divididos en moléculas de tres carbonos que corresponden a la dihidroxiacetona y al gliceraldehído-3-fosfato, donde son oxidados a fosfoenolpiruvato y finalmente reducido mediante NADH a ácido láctico (Law, 1997; Tamime *et al.*, 2000).

La otra vía es conocida como fermentación heteroláctica, debido a que no sólo se obtiene ácido láctico, si no también CO₂ y acetato. Cuando la lactosa de la leche ha sido introducida al interior de la célula, esta es hidrolizada mediante el mismo proceso que en la vía homofermentativa, no obstante, la ruta de obtención de energía cambia en este

paso, debido a que las bacterias que siguen esta vía no cuentan con aldolasa ni con la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, derivan la ruta catabólica de las hexosas hacia la fructosa-6-fosfato fosfoacetolasa con un rendimiento de tres moléculas de acetato y dos de lactato por cada dos moléculas de glucosa (Tamime *et al.*, 2000).

2.2.1. Mecanismo proteolítico de las bacterias ácido lácticas durante la fermentación de leche

Las BAL se definen como bacterias Gram positivas, no esporuladas, catalasa negativo, anaerobias facultativas y con metabolismo fermentativo. Incluyen a los géneros microbianos *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*; adquiriendo mayor importancia el primero de ellos, debido a que distintos *Lactobacillus* son utilizados como probióticos o cultivos iniciadores para la obtención de péptidos bioactivos (Savijoki *et al.*, 2006).

Para que estas bacterias cumplan con un proceso fermentativo exitoso, además de la fuente de carbono adquirida a través de la lactosa presente en la leche, es necesario una fuente de nitrógeno que le permita su desarrollo. Las BAL son de las bacterias más exigentes en este aspecto, por lo tanto adquieren este nutriente a través de la proteólisis de las caseínas que componen a la leche. Para ello cuentan con un sistema general que degrada proteínas de gran tamaño a péptidos y posteriormente a aminoácidos de fácil asimilación. Si bien, la mayoría de las BAL cuentan con este sistema de degradación de proteínas, éste es fácilmente alterado por las condiciones ambientales que envuelvan a determinado género durante su desarrollo, obligando a las bacterias a buscar alternativas de sobrevivencia mediante la inducción de genes que se encuentran reprimidos de forma natural (Kunji, Mierau, Hagting, Poolman y Konings, 1996; Savijoki *et al.*, 2006).

La degradación de las proteínas comienza con el uso de proteinasas presentes en la pared celular de las bacterias denominadas PrtP; estas enzimas proteolíticas mantienen una alta preferencia por caseínas hidrofóbicas y ricas en Pro, lo que conduce a una degradación de la estructura secundaria de las caseínas, aumentando la susceptibilidad de las mismas para ser hidrolizadas. Existen dos tipos de PrtP, la primera de ellas llamada PI y con una clara preferencia para la proteólisis de la β -caseína, llega a formar hasta 100 oligopéptidos de entre 4 y 30 residuos de aminoácidos, sin embargo también es capaz de tener actividad sobre la κ -caseína en una menor proporción; el

segundo tipo es conocido como PIII, siendo igualmente eficaz para la escisión de α , β y κ -caseína (Savijoki *et al.*, 2006).

Una vez disminuido el tamaño de las proteínas, es necesario transportarlas hacia el interior de la célula donde se encuentran las distintas peptidasas que continúan con el corte hasta obtener una fuente de nitrógeno de mayor accesibilidad; para esto las BAL y más en específico, los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus* cuentan con un sistema genómico de transportación denominado Opp dependiente de adenosín trifosfato (ATP) y accionado cuando encuentran en el medio oligopéptidos aprovechables para su desarrollo. Mediante el uso de este sistema, las BAL son capaces de introducir secuencias de hasta 18 restos de aminoácidos (Kunji *et al.*, 1996; Savijoki *et al.*, 2006).

Aunado a este sistema, también es posible la transportación de di y tripéptidos, mediante el uso de otros dos sistemas; el primero de ellos llamado DPP, donde es posible introducir cadenas ramificadas y con relativa hidrofobicidad, utilizando ATP como fuerza motriz, mientras que el segundo, denominado DTPT, es impulsado por fuerza protónica y como consecuencia transporta preferentemente péptidos cargados (Kunji *et al.*, 1996; Savijoki *et al.*, 2006).

Finalmente, al entrar a la célula, el grupo de peptidasas se encarga de desdoblar los oligopéptidos de acuerdo a su especificidad. Las primeras en actuar son las aminopeptidasas PepN, PepC y PepX, la primera actúa sobre los residuos situados en la región N-terminal con preferencia hacia arginina; la segunda de ellas tiene acción en la misma región, sin embargo, prefiere Ala (alanina), Leu (leucina) y Lys (lisina) mientras tanto, la última tiene una marcada distinción por Pro. Para la hidrólisis de di y tripéptidos las BAL cuentan con PepT, PepV y PepD, cuya predilección se inclina hacia aminoácidos no polares incluyendo Leu, Phe, Gly (glicina) y Met (Metionina) (Kunji *et al.*, 1996; Savijoki *et al.*, 2006).

Otras peptidasas más específicas son por ejemplo la PepA que libera residuos ácidos de la región N-terminal de cadenas de entre 3 y 9 residuos de aminoácidos, la PepP cuya preferencia son tripéptidos con una Pro en la parte media, las PepR y PepI actuando sobre dipéptidos que contienen Pro en la penúltima posición y la PepS que ataca a péptidos con 2 a 5 residuos de Arg (Arginina) o aminoácidos aromáticos en la parte N-terminal (Savijoki *et al.*, 2006).

2.3. Péptidos bioactivos.

Un péptido es una fracción proteica con la unión de menos de 100 aminoácidos en su estructura primaria. Esta fracción se considera como bioactiva cuando, además de ofrecer valor nutricional, es capaz de tener un impacto en las funciones fisiológicas del cuerpo humano, repercutiendo en la mejora de la salud del individuo que los ingiere. Por lo tanto es importante remarcar que, un péptido bioactivo debe brindar un efecto biológico objetivo, de acuerdo a la funcionalidad que presente, además de no crear toxicidad, mutagenicidad ni alergias (Hartmann *et al.*, 2007; Möller *et al.*, 2008).

A finales del siglo XX el estudio acerca de péptidos bioactivos comenzó a incrementarse, en específico en el área de los alimentos, debido a que investigaciones revelaron la capacidad de ciertas secuencias aminoacídicas, provenientes de proteínas tanto de origen animal como vegetal para cumplir con esta función (Baró, Jiménez, Martínez-Férez y Bouza, 2001; Hartmann *et al.*, 2007).

Para la industria alimentaria, ha sido de gran interés la investigación de alimentos que, durante el proceso normal de digestión puedan ofrecer características bioactivas, así mismo de la producción de éstos como ingredientes funcionales, mediante procesos de fermentación, maduración o hidrólisis enzimática, siendo la leche, el huevo, la carne, el pescado, la soya y el trigo, algunos de los de mayor atención (Iwaniak *et al.*, 2007).

En años recientes se ha considerado a la leche como una fuente de gran importancia para la obtención de péptidos bioactivos, debido a la diversidad de proteínas presentes en ésta. Si bien es cierto que su actividad es prácticamente nula en la leche como tal, es posible el desencadenamiento de las secuencias funcionales encriptadas en ella, mediante dos métodos (Korhonen *et al.*, 2006; Möller *et al.*, 2008):

- a) Proteólisis con enzimas digestivas:** La vía de acceso a las secuencias proteicas con actividad biológica se obtienen gracias a enzimas digestivas como la pepsina y tripsina, teniendo como precursores a las proteínas completas presentes en la leche; obteniéndose fragmentos con actividad antihipertensiva y de unión con calcio.
- b) Proteólisis microbiana:** Mediante el uso de microorganismos iniciadores y el control de su crecimiento, es posible el aislar de una forma más específica

segmentos proteicos con características bioactivas, aprovechando el sistema proteolítico presente en las bacterias lácticas; pudiendo encontrar efectos antihipertensivos, antioxidantes y antimicrobianos.

En diversas investigaciones se han podido caracterizar ciertas fracciones provenientes de la leche con distintos efectos beneficiosos para la salud, de las cuales se conocen su secuencia, su función biológica y la proteína de origen, inclusive algunas de ellas han recibido un nombre genérico (tabla 2). Estas funciones han impactado directamente sobre los sistemas: cardiovascular, nervioso, gastrointestinal e inmunológico (Meisel y Bockelman, 1999; Vioque *et al.*, 2000; Baró *et al.*, 2001; Korhonen *et al.*, 2006; Hartmann *et al.*, 2007; Möller *et al.*, 2008). Esto ha originado la siguiente clasificación de péptidos bioactivos presentes en la leche:

- Péptidos opioides
- Péptidos antihipertensivos
- Péptidos acarreadores de minerales
- Péptidos antimicrobianos
- Péptidos inmunomoduladores
- Péptidos antioxidantes
- Péptidos antitrombóticos

Tabla 2: Principales péptidos bioactivos derivados de la leche. Tomado de: Meisel *et al.*, 1999 y Hartmann *et al.*, 2007.

Péptido bioactivo	Proteína precursora	Bioactividad
Casomorfina	α y β -caseína	Opioide agonista.
α -lactorfina	α -lactalbúmina	Opioide agonista.
β -lactorfina	β -lactoglobulina	Opioide agonista.
Lactoferrina	Lactoferrina	Opioide antagonista.
Casoxina	κ -caseína	Opioide antagonista.
Casoquininas	α y β -caseína	Inhibición de la ACE.
Lactoquininas	α -lactalbúmina, β -lactoglobulina y seroalbúmina	Inhibición de la ACE.
Inmunopéptidos	α , β y κ -caseína, α -lactalbúmina	Inmunomodulatoria.
Lactoferrina	Lactoferrina	Antimicrobiano.
Casocidina	α_{s2} -caseína	Antimicrobiano.
Isracidina	α_{s1} -caseína	Antimicrobiano.
Fosfopéptidos	α y β -caseína	Acarreadores de minerales
MHIRL, YVEEL, WYSLAMAASDI (Secuencia aminoacídica)	α -caseína, α -lactalbúmina y β -lactoglobulina	Antioxidante

2.4. Definición, características y mecanismo patológico de la trombosis

Se define como trombosis a la formación de una masa hemática sólida (trombo) dentro de los vasos sanguíneos, la cual impide la circulación normal de la sangre por venas o arterias (Kumar, 2005).

En la patología de la trombosis el proceso de coagulación se lleva a cabo sin modificación de las moléculas que en este actúan, sin embargo los cambios en la actividad o en la concentración son lo que determina la formación de trombos (Hoffman, 2003).

Cuando ocurre un daño tisular, el sistema circulatorio activa el proceso hemostático normal, cuyo objetivo es evitar la pérdida de sangre a través de la formación de polímeros entrecruzados de fibrina que reparan dicho daño (Hoffman, 2003; Casanave, Bermúdez y Polini, 2006).

Este proceso comprende una serie de reacciones enzimáticas donde actúan cerca de 12 proteínas, iones calcio y fosfolípidos de la membrana celular, el cual está dividido en tres vías (Franco y Reitsma, 2001; Hoffman, 2003):

- a) **Vía intrínseca:** Proceso de iniciación de la cascada de coagulación cuyo objetivo es la formación del Factor X en su forma activa (X_a), también llamado Factor Stuart Prower o auto protrombina III, la cual es una proteasa de serina, dependiente de vitamina K. Esta vía es desencadenada cuando la sangre entra en contacto con material que reconoce como extraño, ya que es diferente al tejido endotelial que recubre los vasos sanguíneos.
- b) **Vía extrínseca:** Su objetivo es la formación del Factor X activo, que sucede cuando la sangre entra en contacto con tejidos lesionados.
- c) **Vía común:** En ella se entrecruzan los dos procesos anteriores y su finalidad es la formación de polímeros de fibrina para reparar el daño tisular.

En la vía común existen varios factores estrechamente relacionados en los casos que originan los casos de trombosis, los cuales se enumeran a continuación:

- **Fibrinógeno (FG):** La concentración normal en el ser humano oscila entre 2.8 a 3 g/L, cuando esta concentración es rebasada el FG actúa como factor protrombótico, debido a que aumenta en un 30% la viscosidad plasmática e incrementa la agregación plaquetaria. (Fernández-Travieso, 2009).
- **Protrombina (PT):** La hidrólisis de esta proteína, primero en la unión arginina-treonina y después en la arginina-isoleucina por una enzima llamada Factor X_a produce trombina.
- **Trombina (TB):** Serin-proteasa similar a la tripsina y que es el factor principal en la conversión de fibrinógeno en fibrina. Ataca exclusivamente uniones de arginina con un aminoácido cargado positivamente en su sustrato (Velázquez, 2008).
- **Fibrina (FB):** Son monómeros resultantes del corte de la trombina en los enlaces arginina-glicina del fibrinógeno, encargados de las uniones plaquetarias.
- **Antitrombina III (AT):** Serin-proteasa que es el principal inhibidor de la coagulación, ya que es capaz de inhibir a la trombina en forma directa y adicionalmente inhibe factores iniciadores del proceso de coagulación como las enzimas IX_a , X_a , XI_a y XII_a .

- **Proteína C (PC):** Esta proenzima es activada mediante la acción de la trombina y actúa específicamente sobre los factores V_a y VIII_a, que son a su vez cofactores de la enzima X_a.
- **Proteína S (PS):** Es un cofactor de la proteína C (Hoffman, 2003; Franco *et al.*, 2001).

La trombosis es de mayor incidencia en personas de 60 años, sin embargo puede presentarse a cualquier edad. Cuando se forma un coágulo, éste puede llevar a lesiones graves e incluso la muerte, ya que puede ser trasladado mediante el torrente sanguíneo a órganos como el cerebro, corazón y pulmón, ocasionando embolias o infartos al miocardio.

Los factores de riesgo que promueven un desencadenamiento de trombosis pueden clasificarse en dos tipos: los endógenos y los exógenos, los cuales se muestran en la tabla 3 (Franco *et al.*, 2001; Vayá *et al.*, 2002).

Tabla 3: Factores que promueven eventos trombóticos

FACTORES ENDÓGENOS	FACTORES EXÓGENOS
<ul style="list-style-type: none">➤ Deficiencia genética de AT.➤ Deficiencia genética de PC.➤ Deficiencia genética de PS.➤ Producción excesiva de glóbulos rojos.➤ Alta concentración de FG.➤ Sexo femenino.	<ul style="list-style-type: none">➤ Obesidad.➤ Diabetes Mellitus.➤ Tabaquismo.➤ Hipertensión.➤ Hipercolesterolemia.➤ Contar con un catéter en la vena de la ingle.➤ Reposo prolongado.➤ Fracturas de pelvis o piernas.➤ Cirugía reciente en el área de pierna, rodilla o pelvis.➤ Haber dado a luz en los últimos 6 meses.

Dentro de los factores endógenos se encuentra la patología llamada trombofilia la cual se presenta con una incidencia de una persona por cada mil al año y frecuentemente antes de los 45 años. Su origen se debe a deficiencias genéticas hereditarias, que alteran algún factor anticoagulante natural, algunas de estas se describen a continuación (Franco *et al.*, 2001; Acar, Dogan, Altunbas y Turker 2006):

Deficiencia de AT: Debido a una mutación cromosómica se ocasionan dos efectos. El primero de ellos es una deficiencia en los niveles de AT, mientras el segundo se debe a un defecto en el proceso de transcripción del ADN, ocasionando una deficiencia de AT, tanto en su sitio reactivo y en el sitio de unión a heparina.

Deficiencia de PC: Esta mutación cromosómica genera bajas concentraciones, tanto de PC en el plasma sanguíneo como de este misma en su forma activa, la cual es conocida como deficiencia Tipo I. La deficiencia Tipo II se genera cuando existen bajas concentraciones de PC en forma activa pero concentraciones normales de esta misma en el plasma.

Deficiencia de PS: Se manifiesta por una mutación cromosómica, originando tres tipos de deficiencias. Tipo I o cuantitativa, caracterizada por la disminución de la concentración de PS total y de la concentración de PS en su forma libre; La Tipo II o cualitativa es caracterizada por la disminución de la actividad de PS y con concentraciones normales en el plasma sanguíneo; y Tipo III caracterizada por concentraciones normales de PS total y bajos niveles PS libre.

La incidencia de trombosis debida a factores exógenos, puede ser controlada mediante actividad física, una dieta saludable y el mediante el uso de fármacos preventivos como heparina o warfarina (Velázquez, 2008). En la figura 1 se resume el mecanismo bioquímico de la coagulación donde se observan los factores de hipercoagulabilidad en los eventos trombóticos.

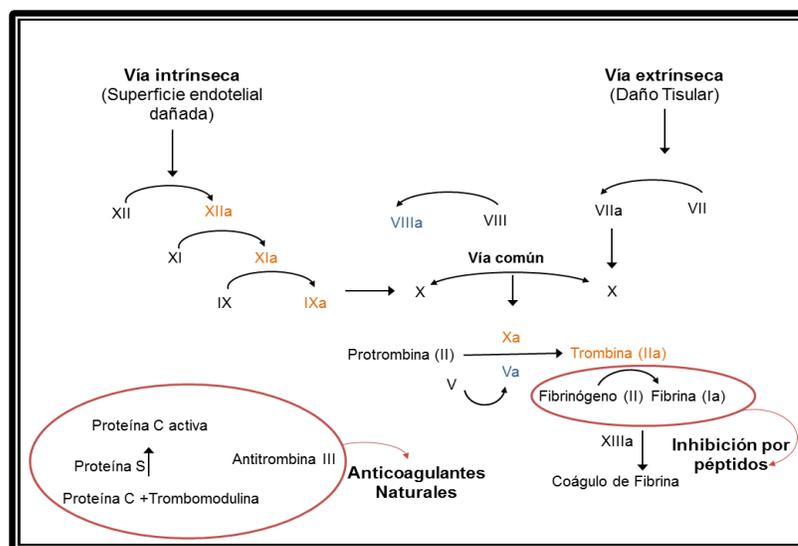


Figura 1: Cascada de la coagulación. Factores naranja son inhibidos por ATIII, mientras que factores azules por PC.

2.4.1 Características y mecanismo de acción de los péptidos antitrombóticos derivados de leche

Un compuesto con características antitrombóticas es definido como aquél que es capaz de prevenir o impedir la formación excesiva de fibrina, dividiéndose en tres categorías distintas (Topol, 2004):

La primera de ellas la conforman los antiagregantes plaquetarios, cuya finalidad es inhibir la agregación de plaquetas para la formación de trombos, las cuales en conjunto con los polímeros entrecruzados de fibrina tienen como objetivo reparar daños tisulares. En este sentido la leche posee una serie de secuencias derivadas de la κ -caseína denominadas casoplatelinas que inhiben la unión de las plaquetas activadas con adenosin difosfato (ADP), además de la unión de la cadena γ del fibrinógeno humano a los sitios específicos de las plaquetas para su conversión en fibrina y envolver todo este conjunto en un denso trombo (Chabance *et al*, 1995; Clare y Swaisgood, 2000).

La fracción principal de las casoplatelinas que tiene este tipo de funcionalidad es el fragmento 106-116 de la κ -caseína, debido a su gran similitud a la cadena γ del fibrinógeno humano (residuos 400-411), sin embargo existen otras fracciones más pequeñas del mismo tipo de caseína con funciones similares; las cuales corresponden al fragmento 106-110 llamado casioprastina obtenido a partir de la hidrólisis con tripsina, capaz de inhibir la unión del fibrinógeno a las plaquetas del torrente sanguíneo. Otro fragmento (residuos 103-111) obtenido por el mismo tipo de hidrólisis, tiene la propiedad de inhibir la agregación plaquetaria, pero no afecta los sitios de unión del fibrinógeno con las mismas (Clare *et al.*, 2000).

Otros dos fragmentos importantes son la región C-terminal del glicomacropéptido derivado de la acción de la quimosina sobre la κ -caseína, cuya actividad inhibitoria tiene acción sobre el factor de agregación plaquetaria Von Willebrand; mientras tanto el segundo fragmento proviene de la lactotransferrina como inhibidor de receptores de ADP (Clare *et al.*, 2000).

La segunda clase de antitrombóticos la conforman los anticoagulantes, cuya función principal es la disminución de la capacidad que tiene la sangre para coagular, mediante la inhibición directa o indirecta de la trombina. Esta clase no ha sido muy

estudiada en lo que respecta a fragmentos derivados de la leche; el reporte más reciente proviene de Rojas-Ronquillo *et al.* (2012), quién logró identificar un fragmento de la región C-terminal de la β -caseína con la secuencia YQEPVLGPVRGPFPIIV, con un peso molecular de 1.88 kDa con la capacidad de inhibir la trombina eficientemente, el cual fue obtenido a través de la fermentación de un medio de caseínas enriquecido con dos fuentes de carbono diferentes, lactosa y extracto de levadura inoculado con *Lactobacillus casei* Shirota

Finalmente, la tercera clase de antitrombóticos son los fibrinolíticos, capaces de desintegrar los coágulos una vez formados mediante la acción de la plasmina. Los fármacos con esta función se encargan de hidrolizar el plasminógeno presente en el torrente sanguíneo como proenzima y convertirlo en la enzima activa plasmina, capaz de desintegrar los polímeros de fibrina mediante el corte; cuando se suministra este tipo de tratamiento es común combinarlo con alguno de los dos tipos de antitrombóticos anteriores, debido que durante la destrucción del trombo puede eliminarse trombina, capaz de tener actividad sobre el fibrinógeno y crear nuevamente fibrina. Actualmente no se tienen reportes de péptidos derivados de leche que contengan esta actividad, ya que la mayoría de las secuencias aminoacídicas actúan como inhibidores y no como enzimas (Clare *et al.*, 2000; Mendoza, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 General

Evaluar la capacidad antitrombótica de fracciones peptídicas producidas en una leche fermentada por *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus johnsonii*, a través de ensayos enzimáticos para determinar el grado de inhibición de trombina.

3.2 Específicos

- Realizar una fermentación de un sistema inoculado con *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus johnsonii*, para determinar los cambios de pH y obtener las fracciones peptídicas.
- Determinar la concentración de grupos amino libres de las fracciones peptídicas obtenidas en la fermentación, mediante el método del ácido trinitrobenzensulfónico, para determinar la capacidad proteolítica de las dos cepas analizadas.
- Separar los péptidos obtenidos durante la fermentación de leche, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida Tris-Tricina-SDS-PAGE, a fin de determinar los pesos moleculares de las fracciones peptídicas.
- Evaluar el efecto antitrombótico de las fracciones peptídicas por medio de ensayos enzimáticos, para determinar la capacidad de inhibición de la trombina.

4. METODOLOGÍA

4.1. Obtención de BAL utilizadas para los sistemas de fermentación

Se utilizaron dos cepas mesófilas de BAL, las cuales fueron *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus johnsonii*; la primera de ellas proporcionada por el Laboratorio de Biotecnología Alimentaria de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y conservada en tubos con caldo MRS (DIBICO) en condiciones de refrigeración. La segunda se aisló de una leche fermentada comercial (Chamyto), siguiendo la metodología descrita a continuación.

4.1.1 Aislamiento de *Lactobacillus johnsonii* a partir de un producto lácteo fermentado comercial

Se prepararon diluciones decimales (10^{-1} a 10^{-6}) del producto comercial en agua peptonada (DIBICO) preparada según indicaciones del fabricante. Se sembraron por duplicado 0.1mL de las diluciones 10^{-4} a 10^{-6} en cajas Petri con agar MRS en condiciones asépticas, mediante la técnica de siembra en superficie; el agar MRS fue preparado a partir de caldo MRS, incorporando 1.1% de agar bacteriológico (BIOXON) y posteriormente se esterilizó en condiciones estándar. Cada una de las cajas Petri se incubaron a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 72h.

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el aislamiento de la cepa mediante morfología colonial y tinción de Gram observada al microscopio en una resolución de 100X. Una vez comprobada la morfología característica de la cepa, se transfirió una colonia característica a tubos con caldo MRS esterilizado, se incubó por 48h para su multiplicación y posterior almacenamiento en refrigeración. El mantenimiento se realizó resembrando en caldo MRS cada tres meses.

4.1.2. Acondicionamiento, propagación y cultivo madre de BAL

Se tomó 1 mL de caldo MRS de los tubos de mantenimiento y se inoculó en tubos con 9 mL de una disolución de leche pasteurizada (90°C por 10 min) al 10% (p/v). La

disolución se preparó con leche descremada en polvo (Dairy America), disuelta en agua destilada. Los tubos se incubaron a $37\pm 1^\circ\text{C}$ por 48h, verificando la pureza de los cultivos por tinción de Gram.

Los cultivos madre se prepararon de manera independiente para cada cepa. Se colocaron, en matraces Erlenmeyer de 250 mL previamente esterilizados 150 mL de leche descremada al 10%. La leche se pasteurizó a 90°C por 10 min y se inoculó con 1 mL de los tubos con leche descremada al 10% de cada una de las cepas acondicionadas. Cada cultivo madre fue incubado por 36 h y al término se almacenaron en refrigeración a 4°C . De cada uno de los matraces madre se realizó cuenta viable en agar MRS.

4.2. Fermentación de leche con *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus johnsonii*

Se prepararon 250 mL de leche descremada al 10% con 2% de lactosa (BIOXON), la cual fue pasteurizada a 90°C por 10 min para evitar la desnaturalización de proteínas, reacciones de Maillard e hidrólisis de carbohidratos. Posteriormente, se inoculó con alrededor de 3×10^8 UFC/mL de cada una de las cepas, con respecto a la cuenta viable analizada 48 h antes del comienzo de la fermentación. Cada fermentación se realizó por triplicado y se incubó a $37\pm 1^\circ\text{C}$.

El proceso fue monitoreado en intervalos de 2 h, durante las primeras diez horas y a partir de las 22 h hasta el fin de la fermentación para determinar el descenso de pH, usando un potenciómetro CONDUCTRONIC pH120. La fermentación se detuvo cuando se alcanzó un pH de 4.5. En cada medida de pH se retiraron en condiciones asépticas, muestras de 7.5 mL y se centrifugaron a 10,000 rpm y 4°C por 10 min en micro-centrífuga, con la finalidad de separar la biomasa generada y los restos de proteína de alto peso molecular. El sobrenadante fue almacenado en tubos Eppendorf a una temperatura de -18°C para su uso en los análisis de proteólisis y enzimáticos.

4.3. Determinación de grupos amino libres mediante el método del ácido Trinitrobencensulfónico (TNBS)

La concentración de péptidos solubles producida durante la fermentación por BAL es posible medirla mediante el uso del TNBS, el cual forma un complejo cromóforo con aminas primarias en condiciones básicas (pH=8.2), con un máximo de absorción a 340nm.

De las muestras obtenidas durante la fermentación de cada cepa, se seleccionaron las muestras donde se observó diferencia significativa en los cambios de pH y se sometieron al procedimiento que se describe a continuación.

1. Se preparó una solución de TNBS al 0.10% (v/v) disuelta en buffer de fosfatos 0.21M (pH=8.2) a partir de una solución comercial de ácido picrisulfónico al 5% (p/v) (SIGMA ALDRICH).
2. En tubos de ensayo recubiertos con papel aluminio se colocaron 2 mL del buffer de fosfatos pH=8.2 y se agregaron 0.250 mL de cada una de las muestras a analizar.
3. Posteriormente se adicionaron 2 mL de la solución de TNBS al 0.10% y se sometió a agitación en vortex por 30 s.
4. Todos los tubos fueron incubados durante 1 h a 50°C para llevar a cabo la reacción, deteniéndose con 4 mL de HCl 0.1 N.
5. Las muestras fueron leídas a 340 nm en celdas de cuarzo con espectrofotómetro GENESYS teniendo como blanco un sistema con los reactivos y agua desionizada.
6. La concentración de las muestras fue determinada a partir de una recta de calibración con glicina (BIORAD) a distintas concentraciones (0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 y 0.25 mg/mL) preparada a partir de una solución patrón de glicina 3 mM y con 1% de dodecil sulfato de sodio (SDS).
7. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y en ausencia de luz por la fotosensibilidad de los reactivos y la reacción.

NOTA: El protocolo de preparación de todas las soluciones de este análisis se encuentra en el apéndice 8.1

4.4. Determinación del contenido de nitrógeno proteico en muestras obtenidas a partir de la fermentación láctica

Con la finalidad de homologar el contenido de nitrógeno proteico de todas las muestras, para los análisis de electroforesis y de los ensayos enzimáticos, se determinó la concentración mediante el método de Bradford, el cual se describe a continuación.

1. En tubos de ensaye recubiertos con papel aluminio fueron adicionados 0.500 mL de las muestras previamente descongeladas a temperatura ambiente.
2. Enseguida se agregaron 2.5 mL de agua desionizada junto con 2 mL de reactivo de Bradford (SIGMA ALDRICH), se mezclaron durante 30 segundos en vortex y permanecieron en oscuridad por 10 min
3. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia de las muestras en celdas de cuarzo a una longitud de onda de 595 nm con espectrofotómetro (GENESYS), teniendo como blanco un sistema con agua desionizada en sustitución de la muestra.
4. La concentración de la muestra fue determinada a partir de una curva de calibración de seroalbúmina bovina (SIGMA ALDRICH) a distintas concentraciones (0,5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25 mg/L).
5. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

4.5. Separación de péptidos por electroforesis en gel de poliacrilamida Tris-Tricina SDS-PAGE

Las mismas muestras a las que se les determinó la concentración de grupos aminos libres fueron sometidas a una separación por electroforesis Tris-Tricina-SDS-PAGE siguiendo el procedimiento propuesto por González-Olivares, Jiménez-Guzmán, Cruz-Guerrero y Rodríguez-Serrano (2011) con algunas modificaciones, el cual se describe a continuación.

4.5.1. Preparación de muestras

Una alícuota de 40 μL de las muestras estandarizadas a una concentración de proteína de 150 ppm fueron colocados en tubos Eppendorf, adicionando 20 μL de buffer colorante y 3 μL de β -mercaptoetanol. Posteriormente fueron incubados a 40°C por 30 min e inyectados en los carriles formados por el gel de concentración.

El estándar de peso molecular (Polypeptide Estándar BIORAD) se preparó adicionando 4 μL del mismo junto con 20 μL de buffer TRIS-HCl 0.05M pH=6.8, 20 μL de buffer colorante, 20 μL de agua desionizada y 3 μL de β -mercaptoetanol. El estándar se calentó a baño maría por 5 min a 90°C.

Las muestras y el estándar de pesos moleculares, se prepararon después de que transcurrió el tiempo de polimerización de los geles de electroforesis.

4.5.2. Procedimiento

1. Para generar el gel de separación se procedió a preparar una solución de acrilamida al 16.5%, tomando como base una solución stock al 30% de acrilamida y diluyendo con buffer de separación pH=8.45. Junto con esta solución se adicionaron 160 μL de SDS al 10%. Esta mezcla fue desgasificada a vacío en un matraz kitazato de 25mL por un intervalo de tiempo de 15 min y con agitación suave, con agitador magnético.
2. Transcurrido este tiempo se adicionaron al matraz kitazato 35 μL de persulfato de amonio al 10% y 5 μL de trimetil-N-diamina (TEMED) BIORAD®, se agitó de forma manual para incorporar los reactivos y se trasladó rápidamente al equipo de electroforesis, llenando hasta 3/5 partes de los cristales.
3. Enseguida fueron agregados 2 mL de agua desionizada para ayudar en el proceso de compactación del gel durante su polimerización que duró alrededor de 6 h.
4. Al término de la polimerización del gel de separación, se procedió a generar el gel de concentración al 4% de acrilamida a partir de la solución stock al 30%. La solución se preparó con buffer de separación pH=8.45. Se mezcló con 160 μL de SDS y se desgasificó bajo las mismas condiciones que para el gel de separación.

5. Al culminar el tiempo de desgasificación se añadieron 50 μ L de persulfato de amonio al 10% y 5 μ L de TEMED, homogenizando manualmente y colocando de forma inmediata sobre el gel de separación al cual se le había eliminado el agua desionizada previamente.
6. Posteriormente se colocaron los peines sobre el gel de concentración y se le acondicionó Parafilm, completando la polimerización de ambos geles por 12 h en refrigeración.
7. Transcurrido el tiempo de polimerización se retiraron los peines y los cristales fueron instalados en la cámara de electroforesis, donde también se adicionaron 300 mL de buffer de corrida (BIORAD) (1X) y pH= 8.25 evitando fugas del sistema.
8. Subsecuentemente se inyectaron 15 μ L de cada una de las muestras acondicionadas anteriormente en cada uno de los carriles, dejando uno libre para la inyección del estándar. A continuación, se llevaron a la cámara de electroforesis donde se adicionaron otros 300 mL del buffer de corrida y se procedió a conectar la fuente de poder para dar comienzo a la electroforesis.
9. La corrida se inició a 30 V hasta que las muestras cruzaron el gel de separación (alrededor de dos horas), seguido de un cambio de voltaje a 95 V durante la separación de los péptidos que duró entre 7 y 8 h para culminar el frente de migración. Todo el proceso fue llevado en un baño de hielo para disminuir el calor generado por la corriente eléctrica.
10. Para fijar los péptidos, al término de la corrida los geles fueron colocados en una solución de ácido acético al 7.5% (v/v) durante una hora con agitación mecánica suave.
11. Sucesivamente los geles se colocaron en una solución de azul de Comassie G-250 por espacio de 10h con agitación mecánica suave.
12. Para desteñir los geles, se sumergieron en una solución de ácido acético al 7% (v/v) con 10% (v/v) de metanol por espacio de 4h y con las mismas condiciones de agitación descritas con anterioridad.
13. Finalmente, los geles se enjuagaron con agua desionizada y se obtuvo la imagen de estos para ser analizados con el software de análisis de imagen Image J, determinándose los pesos moleculares de acuerdo al estándar de polipéptidos (BIORAD) utilizado.
14. La determinación fue realizada por duplicado.

NOTA: El protocolo de preparación de todas las soluciones de este análisis se encuentra en el apéndice 8.1

4.6. Ensayo enzimático de inhibición de trombina.

Se realizaron ensayos enzimáticos de cuatro puntos de la cinética de fermentación, para determinar el grado de inhibición de trombina de los péptidos generados durante todo el proceso fermentativo. Los cuales consistieron en el tiempo cero, inicial, medio y final.

Las muestras seleccionadas fueron descongeladas a temperatura ambiente y estandarizadas en un contenido de proteína de 150 ppm mediante dilución con buffer de reacción TRIS-HCl 0.05M (pH=7.2) y con 0.12mM de NaCl. La metodología seguida fue la propuesta por Zhang, Zhang y Xu (2008) con algunas modificaciones.

1. Se preparó una solución de trombina a una concentración de 12UI/mL a partir de reactivo de trombina humana de 150UI/mL (SIGMA ALDRICH) y una de fibrinógeno al 0.10% mediante fibrinógeno humano (SIGMA ALDRICH) 50-70% de proteína (>80% de proteína coagulable). Ambas soluciones fueron preparadas con el buffer de reacción descrito anteriormente.
2. En tubos de ensayo cubiertos con papel aluminio se mezclaron 280 μ L de la solución de fibrinógeno al 0.10% con 80 μ L de la muestra a analizar y se midió la absorbancia en celdas de cuarzo a una longitud de onda de 405nm en un espectrofotómetro (GENESYS). Esta absorbancia fue considerada como blanco de la muestra (SB).
3. A los tubos anteriores se les adicionaron 20 μ L de la solución de trombina 12UI/mL, posteriormente fueron agitados e incubados por 10 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo se midió nuevamente la absorbancia a la misma longitud de onda; etiquetándose como absorbancia de la muestra (S).
4. En tubos de ensayo distintos se adicionaron conjuntamente 80 μ L del buffer de reacción y 280 μ L de la solución de fibrinógeno al 0.10%. Al terminar de mezclarlos se midió la absorbancia en celdas de cuarzo a 405 nm. Este resultado se conoció como control del blanco (CB).

5. Enseguida se les adicionaron 20 μ L de la solución de trombina 12 UI/mL y fueron incubados por 10 min a 37°C, para finalmente medir la absorbancia a 405 nm conocida como control (C).
6. El porcentaje de inhibición de trombina se calculó con la siguiente formula:

$$\% \text{ inhibición de trombina} = \frac{(C - CB) - (S - SB)}{(C - CB)} \times 100$$

7. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y en ausencia de luz.

NOTA: El protocolo de preparación de todas las soluciones de este análisis se encuentra en el apéndice 8.1

4.7. Análisis Estadístico

Los datos experimentales obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), realizándose una comparación de medias por el método de Tukey's a un nivel de significancia de $p=0.05$, con ayuda del software estadístico NCSS-2007.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Fermentación de leche

La producción de ácido láctico mostró una diferencia significativa ($p=0.05$) entre las dos especies utilizadas en el estudio, durante la fermentación llevada a cabo con *Lactobacillus casei* Shirota se llegó al pH de 4.5 en 33 h, mientras que en la fermentación con *Lactobacillus johnsonii*; el pH se alcanzó a las 26 h (tabla 4).

Las BAL se multiplican hasta un pH de 4.5. Sin embargo, estudios han demostrado que la multiplicación sigue hasta por 5 días más después del tiempo de fermentación. De Vuyst (2000) ha señalado que la desaceleración en el crecimiento de las bacterias lácticas durante la fermentación es gradual hasta encontrar el equilibrio entre células viables y senescentes. Esto lleva a la célula a entrar en un estado parcialmente inactivo, en el cual, la multiplicación se ve disminuida pero no eliminada. Después de que se alcanza el pH de 4.5, desciende tanto la cuenta viable de las BAL como el pH del medio, hasta un valor 4.0. Esto sucede por efecto de la introducción de ácido láctico a la membrana celular y la disminución de azúcares fermentables (Rajiv y Shah, 1996).

Tabla 4: Cambios en el pH durante el periodo de fermentación por *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus johnsonii*.

<i>Lactobacillus casei</i> Shirota		<i>Lactobacillus johnsonii</i>	
Tiempo (h)	pH	Tiempo (h)	pH
0	6.72±0 ⁱ	0	6.74±0 ^f
2	6.64±0.01 ^{A,h}	2	6.69±0.01 ^{B,e}
4	6.61±0.01 ^{A,h}	4	6.65±0.01 ^{B,e}
6	6.57±0.01 ^h	10	6.35±0.02 ^{B,d}
10	6.42±0.01 ^{A,g}	22	4.87±0.05 ^c
24	5.51±0.04 ^{A,f}	24	4.65±0.02 ^{B,b}
26	5.25±0.01 ^{A,e}	26	4.54±0.02 ^{B,a}
28	5.02±0.01 ^d		
30	4.81±0.02 ^c		
32	4.61±0.03 ^b		
33	4.50±0.02 ^a		

Letras mayúsculas distintas indican diferencia significativa entre grupos ($p = 0.05$). Letras minúsculas distintas indican diferencia significativa dentro de grupos ($p = 0.05$)

Durante la fermentación láctica, la producción de ácido está relacionada directamente con el desarrollo microbiano. De acuerdo a esta información, se encontró diferencia significativa ($p=0.05$) en la fase adaptativa. En el caso de *Lactobacillus casei* Shirota esta fase aparentemente se mantuvo aproximadamente 6 h, mientras que en leche fermentada con *Lactobacillus johnsonii*, esta etapa duró sólo 4 h. Adicionalmente, se observó que la fase de aceleración y de multiplicación logarítmica de *Lactobacillus johnsonii* fue más rápida, con un tiempo aproximado de 14 h. En el caso de *Lactobacillus casei* Shirota, esta fase fue en apariencia constante hasta el final de la fermentación.

La desaceleración y fase estacionaria, no se distinguieron para ninguno de los dos casos (Figura 2), sin embargo, los resultados encontrados son similares con los obtenidos por Ostile, Treimo y Narvhus (2005) y Rojas –Ronquillo (2009). Los cuales reportaron descensos de pH que corresponden a lo observado en este estudio y para los mismos microorganismos

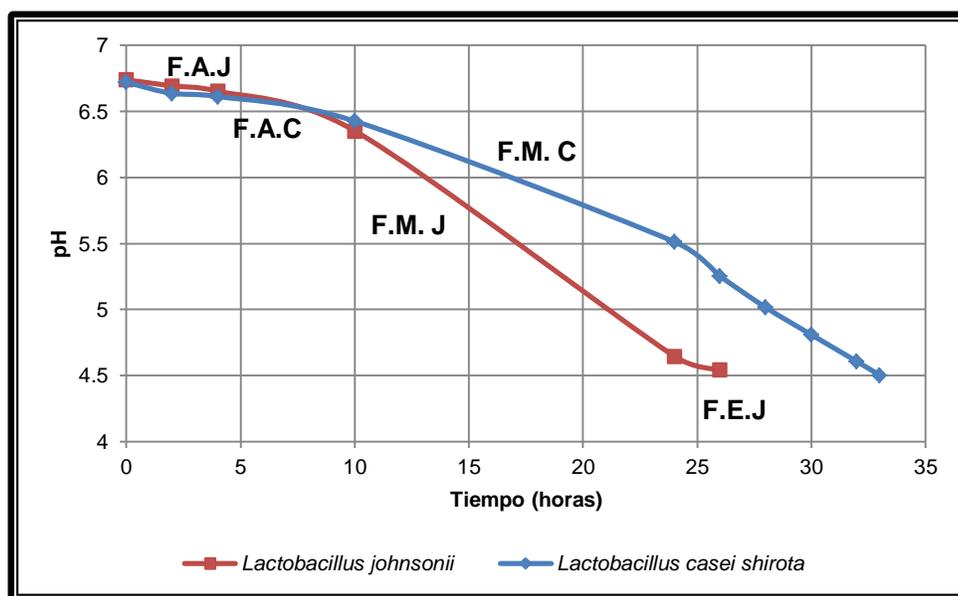


Figura 2: Relación de cambios de pH con la curva de crecimiento microbiano en una fermentación de leche con *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus johnsonii*

Fases Aparentes de la curva de crecimiento microbiano: F.A.: Fase de Adaptación; F.M.: Fase de Multiplicación; F.E: Fase Estacionaria; C: *Lactobacillus casei* Shirota y J: *Lactobacillus johnsonii*.

Las diferencias encontradas son atribuibles a la fisiología y necesidades nutricionales que presenta cada BAL, debido a que ambos sistemas fueron inoculados con bacterias homofermentativas, mesófilas, incubadas a la misma temperatura y con el mismo porcentaje de carbohidratos fermentables. Los sistemas de fermentación fueron inoculados después de 48 horas de haber realizado la cuenta viable, a partir de un cultivo madre que se mantuvo en refrigeración. Así que, la concentración de los microorganismos en el inóculo se mantuvo sin variación significativa hasta el momento de su incorporación al sistema de fermentación, ya que algunos autores han demostrado que no existe diferencia significativa en la viabilidad de las BAL probióticas cuando se almacenan en refrigeración a 4°C, inclusive por 35 días (Rajiv *et al.*, 1996; Kailasapathy, 2006).

Tanto la fase de adaptación como la de multiplicación transitan relativamente rápido y se ven influenciadas por las características morfológicas y fisiológicas de cada cepa, lo cual es evidente durante la fermentación de leche (Rogers y Whittier, 1928; De Vuyst, 2000).

De acuerdo a lo anterior, *Lactobacillus johnsonii* tuvo una mejor adaptación al medio ya que tuvo una mayor velocidad de multiplicación y la fase estacionaria se alcanzó en menor tiempo comparado con *Lactobacillus casei* Shirota. Sin embargo, este último, presentó una velocidad máxima de multiplicación en el intervalo de tiempo de entre las 10-24 horas. En este lapso de tiempo se tuvo un pH entre 6.42 y 5.51, lo cual coincide con lo citado por De Vuyst (2000), quién expresa que las BAL tienen una multiplicación óptima a pH entre 5.5 y 6.0.

Posteriormente, *Lactobacillus casei* Shirota sigue produciendo ácido láctico, con un descenso de pH significativo ($p=0.05$) hasta el final de la fermentación. Estos datos son similares a lo obtenido por Rojas-Ronquillo (2009).

5.2. Determinación de grupos amino libres.

Durante el proceso de fermentación, se observó un incremento significativo ($p=0.05$) en la concentración de grupos amino libres. Se observó una mayor actividad proteolítica en la leche fermentada por *Lactobacillus casei* Shirota en comparación con la fermentada por

Lactobacillus johnsonii, las cuales alcanzaron una concentración máxima de 616.67 µg/L y de 577.00 µg/L, respectivamente (tabla 5).

Tabla 5: Proteólisis producida durante la fermentación por *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus johnsonii*.

<i>Lactobacillus casei</i> Shirota		<i>Lactobacillus johnsonii</i>	
Tiempo de Fermentación (h)	[NH ₂ -] (µg/L)	Tiempo de Fermentación (h)	[NH ₂ -] (µg/L)
0	112.67±0.58 ^{A,f}	0	335.00±1.00 ^{B,f}
4	208.00±2.00 ^{A,e}	4	372.33±2.52 ^{B,e}
10	389.00±7.55 ^{A,d}	10	383.67±3.51 ^{A,d}
26	582.33±4.93 ^{A,c}	22	432.33±3.21 ^c
30	604.33±2.52 ^b	24	492.33±1.53 ^b
33	616.67±1.53 ^a	26	577.00±2.00 ^{A,a}

Letras mayúsculas distintas indican diferencia significativa entre grupos ($p = 0.05$). Letras minúsculas distintas indican diferencia significativa dentro de grupos ($p = 0.05$)

Este comportamiento puede ser atribuible a que las BAL son microorganismos con altos requerimientos nutricionales para su desarrollo, en específico de nitrógeno, los cuáles pueden ir desde di y tripéptidos hasta aminoácidos libres específicos para la fisiología de cada cepa (Julliard *et al.*, 1995).

Por otro lado, se sabe que es en la especificidad del sistema proteolítico de cada cepa donde está la diferencia en la concentración de grupos amino libres encontrada en el estudio. Por ejemplo, en el caso de *Lactobacillus casei* Shirota, se ha reportado que exhibe una auxotrofia mayor que otras bacterias lácticas, esto se puede deber a su bajo nivel de actividad dipeptidasa (Requena, Peláez y Fox 1993). Adicionalmente, en el caso de *Lactobacillus johnsonii*, este requiere de nutrientes nitrogenados menos específicos o su actividad intracelular de aminopeptidasas y peptidasas es muy eficiente, lo cual hace que la acumulación de péptidos sea menor, lo cual es comparable a lo encontrado en estudios similares realizados por Shihata y Shah (2000) y Donkor, Henriksson, Singh, Vasilevic y Shah (2007).

La primera diferencia significativa en la actividad proteolítica entre las especies utilizadas se presentó a las 4 h en donde *Lactobacillus casei* Shirota exhibió una concentración de 208.00 µg/L mientras que *Lactobacillus johnsonii* presentó una

concentración de 372.33 $\mu\text{g/L}$. Estos resultados podrían deberse a la concentración inicial de péptidos presente en la leche y por la mejor fase adaptativa que exhibió esta cepa. Además, es normal encontrar bajas concentraciones de grupos amino libres en los tiempos iniciales, debido a que en las primeras horas de desarrollo, las BAL comienzan el proceso de corte sobre las caseínas utilizando la proteinasa PrtP de su pared celular, formando oligopéptidos con una concentración baja de grupos amino libres (Julliard *et al.*, 1995; Savijoki *et al.*, 2006).

Posteriormente, a las 10 h no se encontró diferencia significativa entre ambas cepas. Estos resultados pueden deberse a que la mayoría de las BAL cuentan con un sistema de transporte de oligopéptidos (Konings, Kuipers y Poolman, 2000). Adicionalmente, no se observaron más cortes peptídicos debido a que, en este tiempo de fermentación ambas especies ya habían superado su fase de adaptación. En este sentido se esperaría que los dos sistemas de fermentación se encontrarán en la fase de obtención de nitrógeno o en la etapa de mayor asimilación y como consecuencia, estuvieran expulsando al medio las primeras partes proteicas que no fueran indispensables, las cuales reaccionaron con el TNBS.

En el caso de *Lactobacillus casei* Shirota se observó una proteólisis muy activa durante su fase de crecimiento, esto está relacionado con su mayor multiplicación que se presentó entre las 10 y las 26 h. En este periodo de tiempo las concentraciones de grupos amino libres fueron, al inicio de 389.00 $\mu\text{g/L}$ y aumentó a 582.33 $\mu\text{g/L}$. Mientras tanto en la fermentación con *Lactobacillus johnsonii* las concentraciones fueron de 383.67 $\mu\text{g/L}$ al inicio y de 577.00 $\mu\text{g/L}$ al final.

Este incremento pudo deberse a las necesidades nutricionales de cada especie de BAL, ya que para satisfacerlas, tienen que activar las dipeptidasas y tripeptidasas específicas de cada sistema proteolítico (Julliard *et al.*, 1995; Konings *et al.*, 2000).

Después de la fase de crecimiento ambas especies continuaron con su actividad proteolítica, pero esta actividad fue menor para *Lactobacillus casei* Shirota, para la cual, se observó una desaceleración a partir de las 26 h. Sin embargo, al no existir un equilibrio en la producción de péptidos, se infiere que la BAL siguió hidrolizando proteínas con menor velocidad solamente para cumplir con sus requerimientos nutricionales, ya que el pH óptimo de las proteasas de las BAL se encuentra entre 6.0 y 6.3, pero la actividad

proteolítica continúa con actividad a pH alrededor de 5.4. El medio se encontraba a este último pH cuando se observaron los cambios en la concentración de grupos amino libres (Sanz, 2002).

Por otro lado *Lactobacillus johnsonii* presentó una mayor concentración de grupos amino libres al final de la fermentación (26 h), la cual fue estadísticamente igual que la observada para *Lactobacillus casei* Shirota (tabla 5). Sin embargo, este pudo deberse a dos factores como lo son la actividad proteolítica que siguió en menor medida como se observó con Donkor *et al* (2007) o a la lisis celular. Esta última provoca que se acumulen péptidos en el medio, los cuales se encontraban en la célula. La lisis celular puede ocasionarse por el aumento en la permeabilidad de la membrana celular y por la inserción de ácido láctico, lo cual provocó la muerte de la bacteria. En este lapso de tiempo, se observó el inicio de la fase estacionaria, lo cual ha sido reportado por Konings *et al.* (2000).

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

Mediante la separación de los péptidos por electroforesis en gel de poliacrilamida (Fig. 3 (I) y (II)), se observó una disminución en la concentración de caseínas en la leche (c). De igual manera, se separaron proteínas provenientes del suero lácteo, α -lactoalbúmina (a) y β -lactoglobulina (b), donde aparentemente no hay cambio en la concentración. Esto es debido a que las BAL adquieren su mayor fuente de nitrógeno a partir de caseínas, además de la precipitación que se favorece por el efecto del pH ácido, generado a partir de la producción de ácido láctico (Julliard *et al*, 1995; Konings *et al*, 2000). González *et al.* (2011) determinaron que las BAL en una leche fermentada en refrigeración, utilizan principalmente caseínas disminuyendo la concentración hasta en un 50%, mientras tanto las proteínas del suero no sufren cambios de concentración.

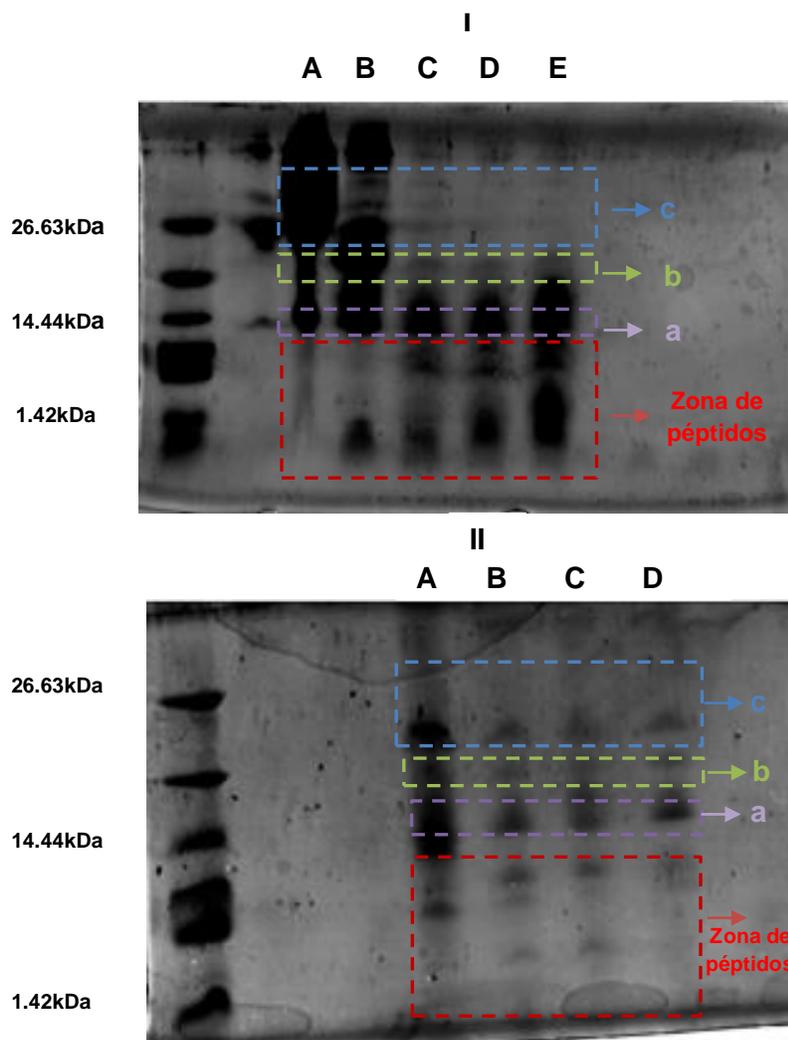


Figura 3: Separación de péptidos por electroforesis Tris-Tricina-SDS-PAGE producidos a partir de la fermentación realizada por *Lactobacillus casei* Shirota (I) a las 4 (A), 10 (B), 26 (C), 30 (D) y 33 (E) horas; y por *Lactobacillus johnsonii* (II) a las 10 (A), 22 (B), 24 (C) y 26 (D) horas. a: α -lactoalbúmina, b: β -lactoglobulina y c: caseínas.

Como se muestra en la figura 3-I, *Lactobacillus casei* Shirota tuvo mayor proteólisis, que la mostrada por *Lactobacillus johnsonii* (figura 3-II), ya que no se observaron bandas entre la primera y segunda banda del estándar las cuales corresponden a los pesos moleculares de las caseínas (19-26 kDa). Por el contrario, en el perfil proteolítico observado para *Lactobacillus johnsonii* (Figura 3-II), se observa, aparición de estas bandas, lo que concuerda con lo obtenido previamente en el análisis de concentración de grupos amino libres durante toda la fermentación.

En la tabla 6 se muestra el perfil completo de los pesos moleculares de los péptidos producidos durante la fermentación láctica tanto de *Lactobacillus casei* Shirota como de *Lactobacillus johnsonii*. Los pesos moleculares fueron obtenidos con el programa Image J, a partir de la curva de calibración con el mejor coeficiente de correlación para cada gel (Apéndice 8.2).

Se observó acumulación de péptidos menores a 1.4 kDa durante toda la fermentación para ambos microorganismos. Sin embargo, la mayor acumulación de péptidos de bajo peso molecular se observó en la leche fermentada con *Lactobacillus casei* Shirota, donde se observó una fracción peptídica de entre 6.2 y 6.9 kDa (tabla 6) a partir de las 26 h y hasta el final de la fermentación.

Mientras que para *Lactobacillus johnsonii* existió una acumulación de una fracción peptídica entre 7.0 y 7.6 kDa (tabla 6). Estos resultados fueron comparables con lo obtenido por Rojas-Ronquillo (2009) y González *et al* (2011).

Tabla 6: Pesos Moleculares de los péptidos generados durante la fermentación en leche por las BAL utilizadas.

Tiempo de Fermentación (h)	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota				<i>Lactobacillus johnsonii</i>			
	10	26	30	33	10	22	24	26
Pesos Moleculares (kDa)	11.10	10.10	10.30	11.10	10.30	10.80	10.60	10.10
	10.90	7.80	8.00	9.10	8.50	7.60	7.00	7.10
	5.30	6.50	6.20	6.90	5.70	5.10	4.80	4.60
	3.60	3.50	3.10	3.40	4.70	3.00	3.30	3.30
	2.10	2.80	2.50	2.20	1.80	1.80	1.60	1.70
	0.97	0.99	1.00	1.00	1.20	1.30	1.30	1.40

Se distinguió, que el sistema proteolítico sigue un patrón similar para ambas especies de BAL. En este perfil se encontraron péptidos de entre 1-2 kDa durante toda la fermentación, aunque los menores pesos moleculares se encontraron en la fermentación con *Lactobacillus casei* Shirota. Estos resultados demuestran que las necesidades de nitrógeno de fácil asimilación son similares para ambos microorganismos (Julliard *et al.*, 1995). Sin embargo, la diferencia entre estos sistemas proteolíticos es evidente por: 1) por la disminución en la concentración de caseínas que fue mayor en la fermentación con *Lactobacillus casei* Shirota y 2) la acumulación de fracciones peptídicas menores a 10 kDa, que de igual manera fue mayor en la fermentación con *Lactobacillus casei* Shirota.

Otra diferencia importante entre las fermentaciones de ambos microorganismos, radica en la obtención de fracciones peptídicas alrededor de 10 y 7 kDa. Estas fracciones fueron producidas por *Lactobacillus johnsonii* durante las primeras horas de fermentación y se mantuvieron hacia el final del estudio, mientras que en el sistema fermentado por *Lactobacillus casei* Shirota se produjeron estos péptidos sólo durante la fase de crecimiento. Esto demuestra la necesidad de una mayor diversidad de aminoácidos para el metabolismo de esta cepa; lo cual está determinado por las diferencias en la auxotrofia para cada una de las BAL (Kunji *et al.*, 1996; Konings *et al.*, 2000).

5.4. Ensayos enzimáticos de inhibición de la trombina

En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo enzimático de inhibición de trombina para cuatro tiempos de fermentación que correspondieron al punto cero, inicial, medio y final del proceso.

En la fermentación de leche por *Lactobacillus casei* Shirota, se encontró una tendencia en la capacidad antitrombótica similar a una campana de Gauss. Estos resultados son consistentes con lo encontrado por Rojas-Ronquillo *et al* (2012) para la fermentación con la misma cepa, en un medio de caseínas de leche enriquecido con lactosa y extracto de levadura.

En el caso de la leche fermentada con *Lactobacillus johnsonii* se observó un claro descenso en la capacidad antitrombótica hacia el final del proceso fermentativo.

Durante el proceso se observó una mayor inhibición de trombina con los péptidos generados por *Lactobacillus johnsonii* (Figura 4-II). La inhibición máxima de los puntos muestreados se determinó a las 10 h con un 31.67%. Este resultado fue diferente a lo encontrado en el mismo tiempo para los péptidos generados por *Lactobacillus casei* Shirota durante la fermentación, en la cual, las fracciones peptídicas obtenidas con este microorganismo tuvieron un 10.04% de inhibición (Figura 4-I). A las 10 h, ambos microorganismos se encuentran en etapa de aceleración y el pH está fuera de rango del pH óptimo.

Estos resultados se pueden deber, nuevamente a las necesidades de nitrógeno de cada una de las cepas. Estas auxotrofías determinan la liberación de estas fracciones de péptidos con capacidad antitrombótica (Clare *et al*, 2000).

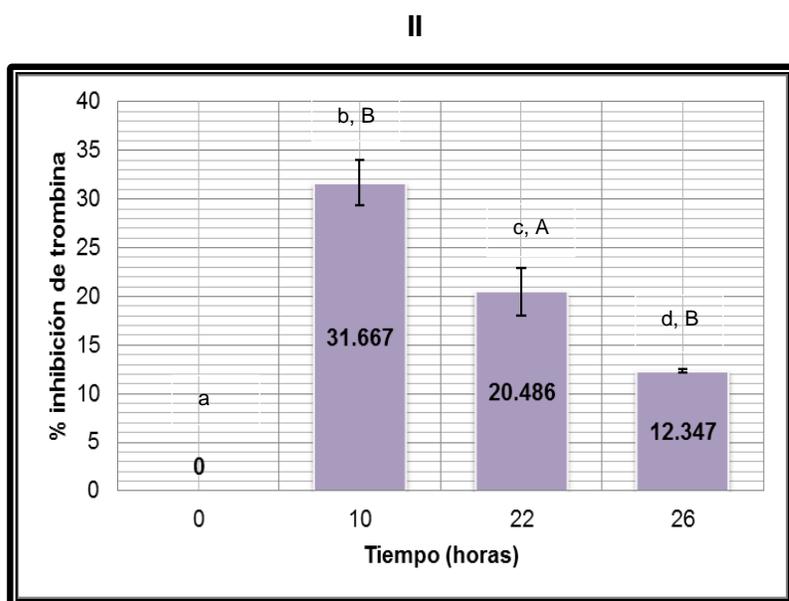
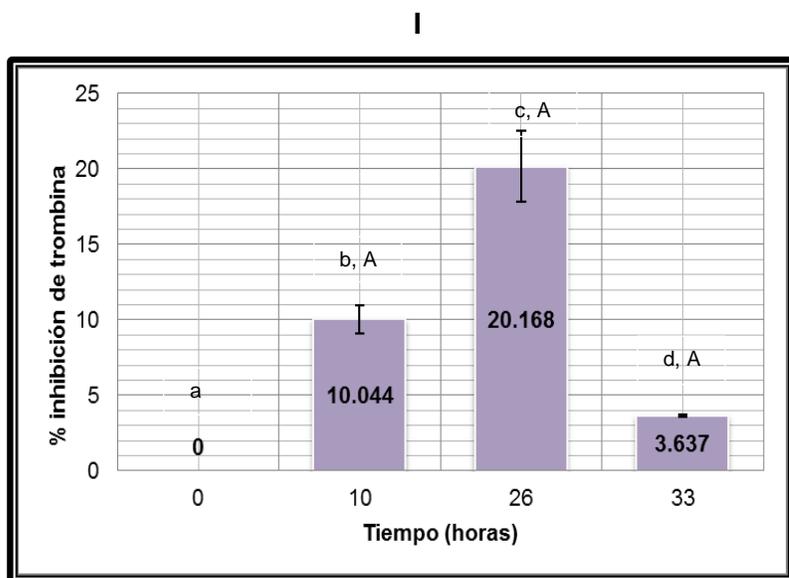


Figura 4: Efecto inhibitorio sobre la trombina de los péptidos generados por *Lactobacillus casei* Shirota (I) y *Lactobacillus johnsonii* (II) a distintos tiempos de fermentación.

Letras mayúsculas distintas indican diferencia significativa a ($p = 0.05$) entre grupos. Letras minúsculas distintas indican diferencia significativa a ($p = 0.05$) dentro de grupos.

Otro factor importante es el perfil proteolítico encontrado a las 10 h, ya que *Lactobacillus johnsonii* exhibió una mayor variedad de péptidos con un peso molecular entre 1 y 8 kDa comparado con *Lactobacillus casei* Shirota y de acuerdo a lo reportado

por Rojas-Ronquillo *et al* (2012) este tipo de péptidos son los que presentan mayor potencial antitrombótico.

En lo que respecta a los puntos medios de la fermentación, los cuales corresponden a las 26 h para *Lactobacillus casei* Shirota y 22 h para *Lactobacillus johnsonii* se observó una inhibición de trombina de 20.168% y 20.486% respectivamente (Figuras 4-I y 4-II), la cual no fue significativa entre grupos. No existen estudios que revelen la actividad antitrombótica durante la fermentación de leche con *Lactobacillus johnsonii*. Los resultados para *Lactobacillus casei* Shirota son similares a lo obtenido por Rojas-Ronquillo *et al* (2012).

El porcentaje de inhibición fue en aumento para para *Lactobacillus casei* Shirota y de disminución para *Lactobacillus johnsonii*. Adicionalmente, hubo aparición de fracciones peptídicas de entre 6 y 7 kDa que no se tenían a las 10 h en el caso de *Lactobacillus casei* Shirota los cuales pudieron aumentar el porcentaje de inhibición; mientras que para *Lactobacillus johnsonii* existió la desaparición de una fracción peptídica de alrededor de 4.70 kDa lo que pudo reducir su potencial inhibitorio.

Al final de la fermentación ambas cepas redujeron su potencial de inhibición de trombina a pesar de encontrarse péptidos de peso molecular similar (Fig. 4-I y 4-II). Esto puede estar relacionado con lo citado por Velázquez (2008), donde se afirma que la trombina tiene preferencia, en su sitio activo, sobre enlaces Arg-Gly. Además Chabance *et al* (1995) y Rojas-Ronquillo *et al.* (2012), han reportado que las secuencias ricas en Pro, Phe o Ile exhibían la mayor inhibición de la acción de la trombina. Esto podría indicar pensar que los péptidos obtenidos en estos tiempos de fermentación tenían secuencias aminoacídicas diferentes o con una tasa baja de estos aminoácidos.

En el tiempo medio, donde no se encontraron diferencias significativas, los sistemas de fermentación tenían un pH de 5.25 y una concentración de grupos amino libres de 582.33 $\mu\text{g/L}$ para *Lactobacillus casei* Shirota; y un pH de 4.87 con una concentración de grupos amino libres de 432.33 $\mu\text{g/L}$ para *Lactobacillus johnsonii*. Esto revela que un nivel proteolítico alto no necesariamente está relacionado con una mayor inhibición de trombina, sin embargo el pH pudiera estar influenciando en la activación de cortes favorables para la obtención de antitrombóticos, debido a las condiciones ambientales a las que se ve sometida cada cepa.

Aunado a esto, también es importante señalar que *Lactobacillus johnsonii* obtuvo su mayor porcentaje de inhibición de trombina a las 10 horas a un un pH de 6.35 (31.67%), mientras que *Lactobacillus casei shirota* a un pH similar (6.42) solo exhibió el 10.04%.

Los resultados obtenidos indican que la obtención de fracciones peptídicas antitrombóticas está relacionada más bien con la cepa utilizada, su sistema proteolítico específico y las auxotrofías que presente de acuerdo con las condiciones ambientales a las que se ha sometido.

6. CONCLUSIONES

- El descenso de pH tiene una relación directa con la velocidad de adaptación en cada una de las cepas estudiadas.
- Las diferencias entre *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus johnsonii*, en la desaceleración durante el crecimiento microbiano se encuentran relacionadas con su actividad proteolítica y con sus auxotrofías.
- *Lactobacillus casei* Shirota presenta mayor capacidad proteolítica que *Lactobacillus johnsonii* bajo las condiciones de fermentación ensayadas.
- La capacidad proteolítica presentada por *Lactobacillus casei* Shirota favoreció la acumulación de péptidos de bajo peso molecular.
- La concentración inicial de péptidos en el medio contribuye a la velocidad de crecimiento de *Lactobacillus johnsonii*, pero no está relacionada con la acumulación de péptidos producidos por este microorganismo durante la fermentación de leche.
- Las fracciones peptídicas producidas por *Lactobacillus johnsonii* presentan capacidad antitrombótica similar a la exhibida por *Lactobacillus casei* Shirota en un menor tiempo de fermentación, lo que eleva su potencial como cepa productora de péptidos bioactivos.

7. PERSPECTIVAS

Debido a que la investigación de péptidos antitrombóticos producidos por distintas cepas de bacterias ácido lácticas durante la fermentación en leche es reducida, es necesario tomar en cuenta las siguientes perspectivas para mejorar el estudio y obtención de estos péptidos, lo que permitirá incorporarlos como tratamiento en padecimientos relacionados con la trombosis.

- Realizar estudios similares con distintas cepas de bacterias ácido lácticas.
- Incorporar un estudio a distintas temperaturas de incubación con las cepas estudiadas, para poder relacionar las condiciones óptimas de obtención de antitrombóticos para cada cepa.
- Integrar un estudio de separación de las fracciones peptídicas obtenidas en cada tiempo de fermentación mediante HPLC de exclusión de tamaño.
- Purificar las fracciones obtenidas de la separación por HPLC en fase reversa.
- Secuenciar las fracciones purificadas por espectroscopia de masas.
- Realizar el ensayo de inhibición de trombina para cada fracción purificada.

8. APÉNDICES

8.1 Preparación de soluciones.

Preparación de soluciones para la determinación de grupos amino libres por TNBS.

Buffer de fosfatos 0.21M (pH=8.2).

Se pesaron 9.2525g de fosfato de potasio di-básico (K_2HPO_4) J.T.Baker® y se aforaron en un matraz volumétrico de 250mL. A la par se pesan 1.4460g J.T. Baker® de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) y se aforan en un matraz volumétrico de 50mL. Posteriormente se agrega la cantidad suficiente de KH_2PO_4 al K_2HPO_4 hasta alcanzar el pH deseado.

Solución de TNBS.

En un matraz volumétrico de 25mL se colocaron 500 μ L del reactivo de ácido picrisulfónico SIGMA ALDRICH® (5% p/v) y se aforó con amortiguador de fosfatos (pH 8.2).

Preparación de soluciones para la electroforesis Tris-Tricina-SDS-PAGE.

Azul de comassie.

En un matraz Erlenmeyer de 1L se colocaron en el siguiente orden 500 mL de agua desionizada, 450mL de alcohol etílico al 96%, 50mL de ácido acético glacial y 2.5g de azul de comassie G-250 BIORAD®, se mezclaron perfectamente y se dejaron en agitación mecánica suave durante toda la noche. Al día siguiente se procedió a filtrar la solución y almacenarla en un frasco ámbar en refrigeración.

Buffer de separación (pH= 8.45).

Se preparó una solución al 3M de TRIS hidroximetil amino metano BIORAD® con 0.3% de SDS BIORAD® en agua desionizada. Posteriormente el pH se ajustó con HCl 6 N.

Solución stock de acrilamida al 30% (pH= 8.45).

A partir de una disolución de acrilamida, 19:1 al 40% BIORAD® se agregó la cantidad de buffer de separación necesaria para preparar una solución al 30%.

Buffer Tris-HCl 0.05M (pH= 6.8).

Se pesaron 6 g de Tris hidroximetil amino metano BIORAD® y se disolvieron en 60 mL de agua desionizada, después se ajustó el pH a 6.8 con HCl 6 N y se aforó a 100 mL con agua desionizada.

Buffer colorante.

En un tubo de ensaye se colocaron en el siguiente orden 0.95mL de agua desionizada, 0.25mL de buffer Tris-HCl 0.05M (pH= 6.8), 0.40 mL de SDS al 10% (p/v), 0.10mL de azul de bromofenol al 1% (p/v) y 0.20mL de glicerol. La mezcla se agitó en vortez hasta la completa disolución de los reactivos y se almacenó en refrigeración.

Buffer de corrida BIORAD® (1X) (pH= 8.25).

A partir de una solución de buffer de corrida Tris-Tricina BIORAD® (10X) se diluyó diez veces con agua desionizada y se ajustó el pH con HCl 6 N.

Solución de SDS al 10% (p/v).

Se pesó 0.1g de SDS BIORAD® y se agregó 1mL de agua desionizada. La solución se almacenó a 0°C.

Solución de persulfato de amonio al 10%.

Se pesó 0.1g de persulfato de amonio BIORAD® y se disolvió con 1mL de buffer de separación pH= 8.45.

NOTA: Esta solución fue preparada justo antes de ser utilizada.

Preparación de soluciones para el ensayo de inhibición de trombina.

Solución patrón de NaCl a 100 mM.

Se colocaron 0.2937g de NaCl J.T. Baker en un matraz volumétrico de 50mL y se aforó con agua desionizada.

Buffer de reacción Tris-HCl 0.05M con 0.12 mM de NaCl.

En un matraz volumétrico de 100mL se colocaron 0.6069g de Tris (hidroximetil) amino metano BIORAD® junto con 120 μ L de la solución patrón de NaCl a 100mM y se aforó con agua desionizada.

8.2. Curvas de Calibración.

Curva de calibración del método de TNBS.

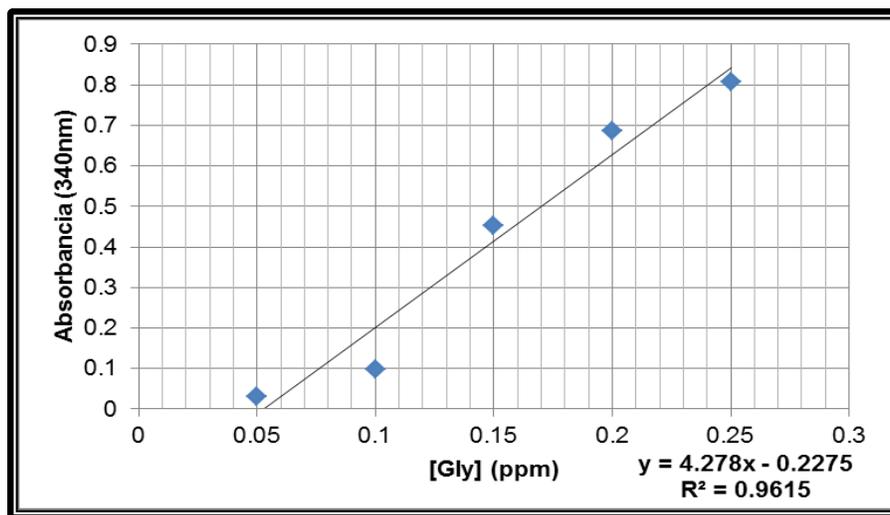


Figura 5: Curva de calibración de glicina para el cálculo de grupos amino libres.

Curva de calibración del método de Bradford.

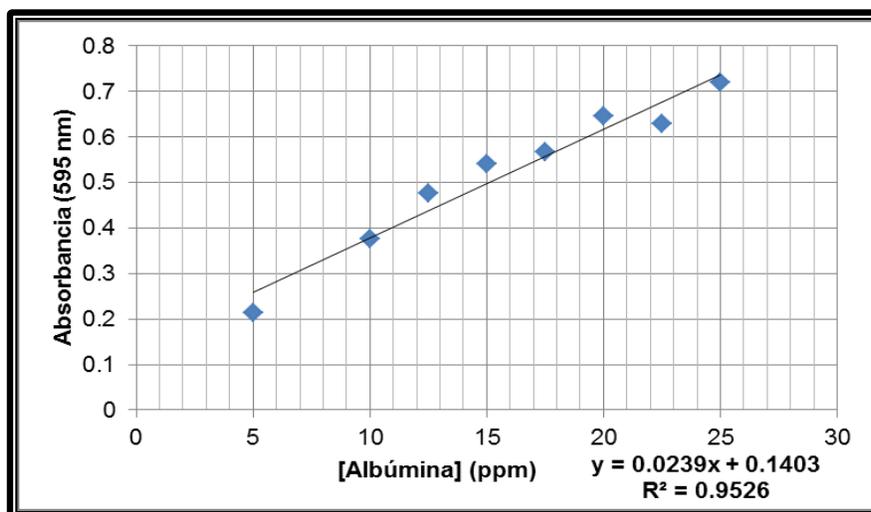


Figura 6: Curva de calibración de seroalbúmina bovina para el cálculo de concentración de nitrógeno proteico en las muestras obtenidas de la fermentación láctica.

Perfil completo de los péptidos del estándar (Polypeptide BIORAD®)

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

Tabla 7: Pesos moleculares de los péptidos utilizados como estándar.

Curva de calibración para el cálculo de los pesos moleculares de acuerdo al estándar utilizado.

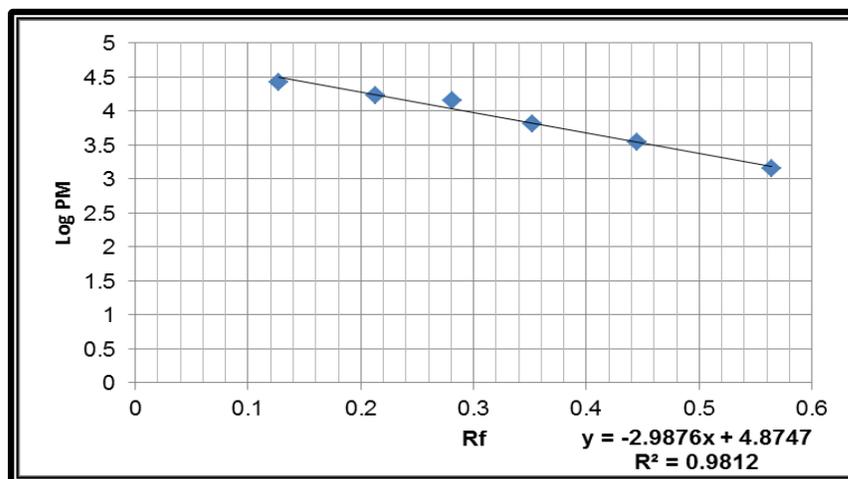


Figura 7: Curva de calibración generada a partir de la electroforesis Tris-Tricina-SDS-PAGE de *Lactobacillus casei* Shirota

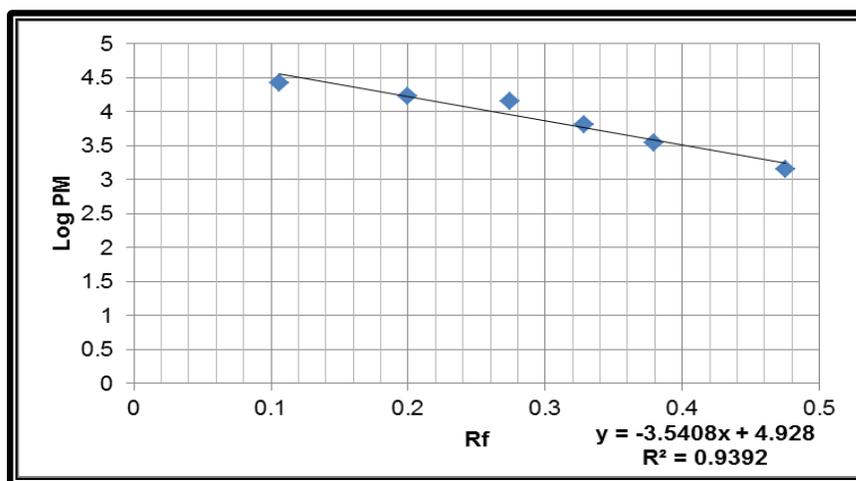


Figura 8: Curva de calibración generada a partir de la electroforesis Tris-Tricina-SDS-PAGE de *Lactobacillus johnsoni*.

9. REFERENCIAS

- Acar, G., Dogan, A., Altunbas, A. y Turker, Y. (2006). Recurrent acute stent thrombosis associated with protein C and S deficiencies. *The International Journal of Cardiovascular Imaging*, 22(1), 333-337. doi: 10.1007/s10554-005-9074-3.
- Alais, C. (1985). *Ciencia de la leche*. Barcelona: Reverté.
- Baró, L., Jiménez, J., Martínez-Férez, A. y Bouza, J.J. (2001). Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *Farmacéutica*, 42(2), 1-5.
- Casanave, E.B., Bermúdez, P.M. y Polini, N.N. (2006). Principal coagulation factors and natural anticoagulants in the armadillo *Chaetophractus villosus* (Mammalia, Xenarthra, Dasypodidae). *Comparative Clinical Pathology*, 14(1), 210-216. doi: 10.1007/s00580-005-0584-0.
- Chabance, B., Jollès, P., Izquierdo, C., Mazoyer, E., Francoual, Ch., Drouet, L. y Fiat, A.M. (1995). Characterization of an antithrombotic peptide from α -casein in newborn plasma after milk ingestion. *British Journal Nutrition*, 73(4), 583-590. doi: 10.1079/BJN19950060.
- Chairman, W.N., Butler, J.E., Ernstrom, C.A., Farrell, H.M., Harwalkar, V.R., Jennes, R. y Whitney, R. (1984). Nomenclature of Proteins of Cow's Milk: Fifth Revision. *American Dairy Science*, 67 (1), 1599-1631.
- Clare, D.A. y Swaisgood, H.E. (2000). Bioactive milk peptides: A prospectus. *Journal Dairy Science*, 83(1), 1187-1195.
- CODEX STAN 243-2003. "Norma del codex para leches fermentadas". Recuperado de: www.codexalimentarius.org. Consultada; Julio 2014.
- De Vuyst, L. (2000). Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food technology and biotechnology*, 38(2), 105-112.
- Donkor, O.N., Henriksson, A., Singh, T.K., Vasiljevic, T. y Shah, N.P. (2007). ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*, 17(1), 1321-1331.

- Fernández Travieso, J.C. (2009). El fibrinógeno como factor de riesgo de enfermedad aterotrombótica. *CENIC Ciencias Biológicas*, 40(1), 1-7.
- Franco, R. y Reitsma, P. (2001). Genetic risk factors of venous thrombosis, *Genética Humana*, 109(1), 1-5, doi: 10.1007/s004390100593.
- González-Olivares, L.G., Jiménez- Guzmán, J., Cruz-Guerrero, A. y Rodríguez-Serrano, G. (2011). Liberación de péptidos bioactivos por bacterias lácticas en leches fermentadas comerciales. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(2), 179-188.
- Gösta, B. (1996). *Manual de industrias lácteas*. Madrid. Vicente Ediciones.
- Hartmann, R. y Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Food Biotechnology*, 18(1), 1-7. Doi: 10.1016/j.copbio.2007.01.013.
- Hoffman, M. (2003). Remodeling the Blood Coagulation Cascade. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 16(1), 17-20.
- Iwaniak, A. y Minkiewicz, P. (2007). Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides. *Food Biochemistry*, 6(3), 1-4.
- Julliard, V., Le Bars, D., Kunji, E.R., Konings, W.N., 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*, 61(8), 3024-3030.
- Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory proprieties of yoghurt. *LWT- Food Science and Technology*, 39(10), 1221-1227
- Konings, W.N., Kok, J., Kuipers, O. y Poolman, B. (2000). Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Current Opinion in Microbiology*, 3(1), 276-282.
- Korhonen, H. y Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(1), 945-960.
- Kumar, V. *Patología estructural y funcional*. Madrid: Elsevier.

- Kunji, E., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B. y Konings, W.N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70(1), 187-221.
- Law, B.A. (1997). *Microbiology and Biochemistry of cheese and fermented milk*. Londres: Blackie Academic & Professional.
- McKenzie, H. (1971). *Milk Proteins. Chemistry and molecular biology*. Nueva York: Academic Press.
- Meisel, H. y Bockelmann, W. (1999). Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76(1), 207-215.
- Mendoza, N. (2008). *Farmacología médica*. México, DF. Panamericana.
- Möller, N.P., Scholz, K.E., Roos, N. y Schrezenmeir. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Europe Journal Nutrition*, 47(1), 171-182. doi: 10.1007/s00394-008-0710-2.
- Montero-Marín, A., Limia-Sánchez, A., Franco-Vargas, E. y Belmonte-Cortés, S. (2006). Estudio de declaraciones nutricionales y saludables en el etiquetado de leches fermentadas. *Nutrición Hospitalaria*, 21(3), 1-3.
- Ostle, H.M., Treimo, J. y Narvhus. (2005). Effect of temperature on growth and metabolism of probiotic bacteria in milk. *International Dairy Journal*, 15(1), 989-997.
- Parra-Ortega, I., Estrada-Gómez, R. y Ruiz-Argüelles, G. (2007) Síndrome de las plaquetas pegajosas, la condición de trombofilia heredada más frecuente en pacientes mexicanos. *Medicina Universitaria*, 9(34), 1-12.
- Rajiv, I.D. y Shah, N.P. (1996). Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, 7(1), 31-41.
- Requena, T., Peláez, C. y Fox, P. (1993). Peptidase and proteinase activity of *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *European Food Research and Technology*, 196(4), 351-355.

- Rogers, L.A. y Whittier, E.O. (1928). Limiting factors in the lactic fermentation. *Journal of Bacteriology*, 7(4). 211-229.
- Rojas-Ronquillo, A., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, 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), 1-8, doi:10.1016/j.idairyj.2012.05.002.
- Rojas-Ronquillo, M.R. (2009). *Perfil de péptidos bioactivos durante la fermentación de leche por Lactobacillus casei y Streptococcus thermophilus*. (Tesis inédita de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F.
- Sanz, Y. (2002). Proteasas y sistemas de transporte de péptidos. En Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (C.S.I.C). *Fundamentos biológicos, procesos y biotecnología de las bacterias lácticas* (1-18). Valencia.
- Savijoki, K., Ingmer, H. y Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(1), 394-406. doi: 10.1007/s00253-006-0427-1.
- Shihata, A. y Shah, N.P. (2000). Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 10(1), 401-408.
- Tamime, A.Y. y Robinson, R.K. (2000). *Yoghurt. Science and Technology*. Boca Raton. Woodhead Publishing.
- Topol, E. (2004). *Cardiología intervencionista*. Madrid. Elsevier.
- Vayá, A., Mira, Y., Martínez, M., Villa, P., Ferrando, F., Estellés, A., Corella, D. y Aznar, J. (2002). Biological risk factors for deep vein thrombosis. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 26(1), 41-53.
- Velázquez, L. (2008). *Farmacología básica y clínica*. Yueng Long. Panamericana.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J. Yust, M. y Millá, F. (2000). Péptidos bioactivos en proteínas de reserva. *Grasas y aceites*, 51(5), 361-365.

Walstra, P. y Jenness, R.(1987). *Química y física lactológica*. Zaragoza. Acribia.

Zhang, B.S., Zhang, W. y Xu, S.Y. (2008). Antioxidant and Antithrombotic Activities of Rapeseed Peptides. *J'Am Oil Chem Society*, 85(1), 521-527. doi: 10.1007/s11746-008-1217-y.

AMIDIQ

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A. C.
"La Interdisciplinariedad en la Ingeniería Química"

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

EMMANUEL PÉREZ ESCALANTE, JAVIER AÑORVE MORGA, ARACELI CASTAÑEDA OVANDO,
ELIZABETH CONTRERAS LÓPEZ, JUDITH JAIMEZ ORDÁZ, LUIS GUILLERMO GONZÁLEZ
OLIVARES

Por la presentación del trabajo:

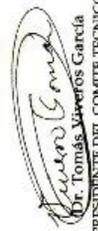
**"DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA DE PÉPTIDOS GENERADOS POR
BACTERIAS LÁCTICAS"**

ID: 763

XXXV Encuentro Nacional
Puerto Vallarta, Jalisco México, 6 al 9 de Mayo de 2014



Dr. Juan Gabriela Segovia Hernández
PRESIDENTE DE AMIDIQ



Dr. Tomás Viveros García
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA DE PÉPTIDOS GENERADOS POR BACTERIAS LÁCTICAS

Emmanuel Pérez Escalante^a, Javier Añorve Morga^a, Araceli Castañeda Ovando^a,
Elizabeth Contreras López^a, Judith Jaimez Ordaz^a, Luis Guillermo González Olivares^{a1}
^aCentro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo,
¹autor de correspondencia lgonzales@uaeh.edu.mx
Carr. Pachuca-Tulancingo km. 4.5, Mineral de la Reforma, Hgo., C.P. 42184, México

RESUMEN

Durante los últimos años la investigación sobre péptidos bioactivos y en especial, los estudios sobre su efecto antitrombótico, ha ido en incremento. Esto debido a que la trombosis es una patología con una mayor incidencia en la última década. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antitrombótica de péptidos liberados mediante fermentación láctica, medida como el grado de inhibición sobre la trombina, enzima encargada de la conversión de fibrinógeno en fibrina. Se probaron dos cepas de bacterias lácticas distintas (*Lactobacillus casei* y *Lactobacillus johnsonii*). Se realizaron cinéticas de fermentación en función del descenso de pH. Se asignó como punto final de fermentación un pH de 4.5. El perfil proteolítico se estudió por medio de las técnicas del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS) y electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se observó que la fase de adaptación de *Lactobacillus casei* fue mayor que la de *Lactobacillus johnsonii*. La proteólisis de *Lactobacillus casei* exhibió una mayor concentración de grupos amino libres comparado con *Lactobacillus johnsonii*. Estos resultados se corroboraron en el análisis de electroforesis. Adicionalmente se observó la aparición de péptidos de peso molecular menor a 1.4 kDa durante toda la fermentación en ambos sistemas. La inhibición de la trombina fue de 31% a las 10 horas de fermentación para *Lactobacillus johnsonii*, disminuyendo significativamente al final del proceso. En el caso de *Lactobacillus casei* la inhibición mayor se obtuvo a las 26 horas (20% de inhibición).

INTRODUCCIÓN

A finales del siglo XX comenzó el estudio sobre péptidos bioactivos en distintos alimentos, tales como: huevo, carne, pescado, soya y leche. Se encontró que las proteínas de la leche cuentan con la mayor diversidad de fracciones proteicas, encriptadas en su secuencia aminoácídica, con características funcionales (4). Una de estas actividades funcionales es la actividad antitrombótica. Esta actividad está definida como la capacidad de inhibir la agregación plaquetaria, inhibir la acción de la trombina o actuar como fibrinolítico (1). Estas fracciones se pueden obtener por el proceso de digestión. En el caso de la leche bovina, las fracciones bioactivas, pueden ser los péptidos resultantes durante la fermentación por bacterias lácticas. Algunos péptidos obtenidos tienen actividad frente a la agregación de plaquetas y sobre la inhibición de la trombina. Dentro de los péptidos con

estas funciones, se encuentran las casoplatelinas antitrombóticas. Las fracciones 106-116 y la 106-110, derivadas de los residuos C terminales de la κ -caseína presentan inhibición de la agregación plaquetaria e inhibición competitiva sobre la trombina, respectivamente. (4,5).

Estas dos características principales posibilitan su inclusión como tratamiento de la trombosis. Esta posibilidad se debe a que impiden la conversión del fibrinógeno en fibrina mediante la inhibición de la trombina. Al tener esta acción, se logra prevenir la formación de trombos que impiden la circulación normal del torrente sanguíneo e incrementan la presión de la pared vascular (1,2).

El motivo de esta investigación fue la identificación y caracterización de fracciones peptídicas presentes en las proteínas de leche, las cuáles exhibían una función inhibitoria a la formación de trombos por conversión de fibrinógeno en fibrina, derivados de la fermentación láctica.

METODOLOGÍA

Aislamiento y propagación de bacterias ácido lácticas. Se aislaron *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus johnsonii* de dos leches fermentadas comerciales. El aislamiento se llevó a cabo inoculando 1 ml de la leche fermentada comercial en un tubo con 10 ml de caldo MRS. Se incubó durante 32 horas a 37°C. Se realizó una siembra sobre placas de agar-MRS para comprobar la morfología colonial y realizar la comprobación de cepa pura por observación al microscopio. La propagación se realizó en 10 mL de leche pasteurizada al 10%, inoculando con un mL del tubo de caldo MRS. Se realizó la preparación del cultivo madre en un matraz con 100 mL de leche pasteurizada al 10%, inoculada con 1 mL del tubo de propagación. Durante toda la propagación, se incubó por 32 horas a 37°C. La pasteurización de las soluciones de leche se llevó a cabo a 90°C por 10 minutos en autoclave. Se realizó cuenta viable para realizar la inoculación en los sistemas de fermentación.

Fermentación. Se prepararon dos sistemas similares para cada una de las cepas, compuestos por una disolución de leche descremada al 10% y enriquecida con 2% de lactosa, pasteurizada a 90°C por 10 minutos y con un inóculo de 300×10^6 UFC para ambos casos. Posteriormente fueron incubados a 37°C monitoreándose el descenso de pH cada 2 horas con la finalidad de obtener una cinética de fermentación hasta obtener un pH=4.5.

Toma de muestras. Cada muestra obtenida durante la cinética de fermentación fue centrifugada a 10000rpm y 4°C por 10 minutos para separar la biomasa. Las muestras se coinservaron en congelación hasta su análisis.

Determinación de grupos amino libre. A cada muestra se le determinó el contenido de grupos amino libres mediante la técnica del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS) en medio

básico (pH=8.2). Se midió la absorbancia a 340 nm y se calculó la concentración de los mismos interpolando en una curva de calibración de glicina.

Determinación de proteína. Se midió la concentración de proteína en cada una de las muestras con el método de Bradford. Se estandarizó por dilución, la concentración de proteína a 150ppm para los análisis de péptidos.

Separación de péptidos por electroforesis. La separación de los péptidos se llevó a cabo por electroforesis (SDS-PAGE) (6), con una modificación a 5% de C y 15% de T. Los geles se corrieron por 6 a 7 horas y con un voltaje de 30V por las primeras 2 horas y de 95V por el resto de la corrida. Se calcularon los pesos moleculares por el analizador de imágenes ImageJ.

Inhibición de trombina. Los estudios antitrombóticos se realizaron mediante la técnica (7) con algunas modificaciones.

Análisis Estadístico. Cada análisis se realizó por triplicado y se sometieron a un análisis de varianza por comparación de medias (ANOVA).

RESULTADOS.

De acuerdo a la figura 1, se pudo observar que durante la cinética de fermentación la etapa de adaptación de *L. johnsonii* fue menor que para *L. casei shirota*. Adicionalmente se observó que esta última bacteria, tuvo un tiempo mayor de fermentación (33 horas) para alcanzar el pH de 4.5. Estos resultados corresponden a los observados en otro estudio, en el cual se observó que durante la fermentación de leche con algunas cepas de *L. johnsonii*, se alcanza un pH menor a 5 en al menos 8 horas antes que con otras cepas de bacterias ácido lácticas incluidas *L. casei shirota*. Por otro lado estos patrones de fermentación reflejan diferencias, debidas a la capacidad de multiplicación de las bacterias lácticas y las necesidades metabólicas que se desarrollan durante el proceso (8).

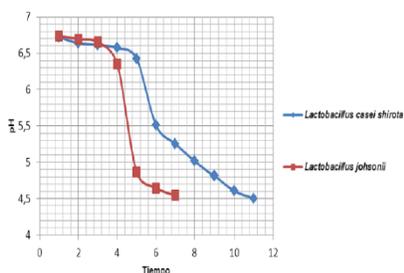


Figura 1. Cinética de fermentación producida por las cepas utilizadas.

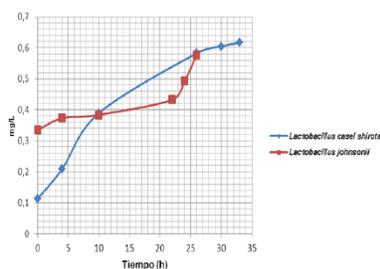


Figura 2. Producción de grupos amino libres.

En la figura 2 se observa que la leche fermentada con *L. casei shirota*, presentó la mayor concentración de grupos amino libres (0.604 mg/L). La concentración de estos grupos tuvo un incremento significativo ($P=0.05$) de las 5 a las 24 horas de fermentación, se mantuvo constante durante el siguiente punto de muestreo y volvió a incrementarse hacia el final de la fermentación. En el caso de la leche fermentada con *L. johnsonnii*, la concentración de grupos amino libres se mantuvo constante durante las primeras 10 horas de fermentación. Después de este tiempo hubo un incremento significativo ($P=0.05$) para finalizar con una concentración de 0.577 mg/L. Se ha observado (igual que ente estudio) que *L. casei shirota* presenta mayor actividad proteolítica, ya que durante el proceso fermentativo esta bacteria láctica tiene mayores requerimientos de aminoácidos para llevar a cabo su metabolismo. Los resultados son coincidentes con algunos otros realizados con cepas de estos microorganismos (6,9).

Como se puede observar en las imágenes de los geles de electroforesis, en la leche fermentada con *L. casei shirota* (figura 3-A) se acumularon péptidos con pesos moleculares cercanos a 1.4 kDa y menores. En el caso de la leche fermentada con *L. johnsonnii* (figura 3-B) se observó acumulación de péptidos mayores a 1.4 kDa. Al mismo tiempo podemos observar que la concentración de proteínas de pesos moleculares mayores a 14.4 kDa disminuyen en su concentración en el proceso. La acumulación de péptidos de bajo peso molecular, es un indicativo de la actividad proteolítica de cada una de las bacterias lácticas (6). Se ha observado que esta acumulación esta relacionada con la capacidad de generar péptidos con actividades biológicas diversas (5). Al mismo tiempo se ha encontrado que *L. casei Shirota* tiene una mayor capacidad proteolítica debido a las proteasas asociadas a su pared celular. Estas proteasas son las que hidrolizan las proteínas de la leche principalmente caseínas. Aunque en *L. johnsonnii* también se encuentran proteasas asociadas a la pared celular, la actividad proteolítica siempre va a ser dependiente de las necesidades nutricionales específicas de cada bacteria láctica (4).



Figura 3. Perfil proteolítico de A) *L. casei shirota* a 4, 10, 26,30 y 33h y B) *L. johnsonnii* a 10, 22,24 y 26 h

Se realizaron los ensayos de inhibición de la trombina para el inicio, el tiempo medio y el final de la fermentación de cada una de las leches fermentadas. La mayor actividad antitrombótica se encontró a las 10 horas de fermentación de la leche con *L. johnsonnii*, el cual fue de 31% (figura 4-A). Esta actividad antitrombótica disminuyó paulatinamente hasta el final de la fermentación. En el caso de la leche fermentada con *L. casei Shirota*, la máxima actividad antitrombótica se encontró a las 26 horas de fermentación y fue de 20% de inhibición de trombina. En este caso del inicio de la fermentación, al tiempo medio se tuvo un incremento, sin embargo al final de la fermentación se tuvo la menor actividad.

Se ha observado que en leches fermentadas con probióticos, la actividad biológica puede ser múltiple en una misma fracción peptídica. Es decir una fracción peptídica puede tener diversas actividades bioactivas, como antihipertensivas, acarreadora de minerales y antitrombóticas al mismo tiempo. Este tipo de péptidos se pueden generar durante las etapas primarias de fermentación y su acumulación es dependiente de que la fracción peptídica no sea hidrolizada para que no se pierda la actividad (3).

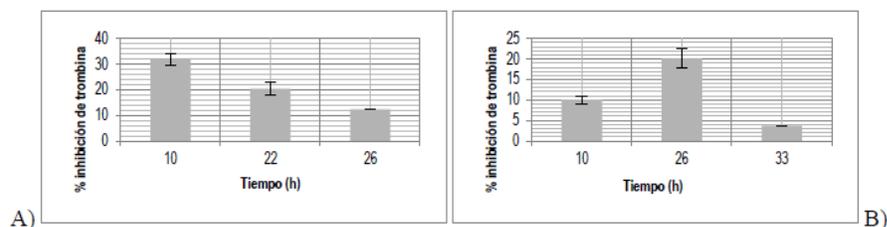


Figura 4. Inhibición de trombina por péptidos producidos por A) *L. johnsonii* y B) *L. casei shirota*.

Conclusiones.

Los resultados mostraron que la capacidad antitrombótica no es dependiente de la concentración de péptidos de bajo peso molecular y difiere para cada leche fermentada debido a la especificidad proteolítica de cada bacteria láctica. Del mismo modo esta actividad puede perderse por la hidrólisis de las fracciones peptídicas que presentan la actividad antitrombótica. Al mismo tiempo se pudo observar que la máxima actividad antitrombótica se obtuvo en leche fermentada con *L. johnsonii* y fue al inicio de la fermentación.

Referencias.

1. Kumar, V., "Patología estructural y funcional". Elsevier, p 306-310, 2005.
2. Fernández Travieso, J.C., "El fibrinógeno como factor de riesgo de enfermedad aterotrombótica", *CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 40, No. 1, p. 1-7, 2009.
3. Rojas -Ronquillo, A., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Rodríguez -Serrano, G., Gómez- Ruiz, L., Reyes -Grajeda, J.P., Jiménez- Guzmán, J., García- Garibay, M., "Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota". *Food Biotechnology*, Vol.26, No.1,p. 1-8, 2012.
4. Hartmann, R., Hans, M., "Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications", *Food Biotechnology*, Vol. 18 No.1, p. 1-7, 2007.
5. Iwaniak, A., Minkiewicz, P., "Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides", *Food Biochemistry*, Vol. 6 No. 3, p. 1-4, 2007.
6. González- Olivares, L.G., Jiménez- Guzmán, J., Cruz -Guerrero, A., Rodríguez- Serrano, G., "Liberación de péptidos bioactivos por bacterias lácticas en leches fermentadas comerciales", *Revista Mexicana de Ingeniería química*, Vol. 10, No. 2, p. 179-188, 2011.
7. Zhang, B.S., Zhang, W., Xu, S.Y., "Antioxidant and Antithrombotic Activities of Rapeseed Peptides", *J'Am Oil Chem Society*, Vol. 85, No. 1, p. 521-527, 2008.