



Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería  
Área Académica de Química

***Evaluación de la viabilidad microbiana y  
capacidad antihipertensiva en bebidas lácteas  
fermentadas comerciales almacenadas en  
condiciones de refrigeración***

Tesis que para obtener el grado de  
Licenciado en Química de Alimentos

Presenta:

José Emiliano Rodríguez Gasca

Director

Dr. Luis Guillermo González Olivares

Codirector

Dr. Emmanuel Pérez Escalante

Mayo, 2024



Mineral de la Reforma, Hgo., a 26 de abril de 2024

Número de control: ICBI-D/509/2024  
 Asunto: Autorización de impresión.

**MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO  
 DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH**

Con fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V, Artículo 51 Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio le comunico que el Jurado asignado al Pasante de la Licenciatura en Química de Alimentos **José Emiliano Rodríguez Gasca**, quien presenta el trabajo de titulación **“Evaluación de la viabilidad microbiana y capacidad antihipertensiva en bebidas lácteas fermentadas comerciales almacenadas en condiciones de refrigeración”**, después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

**Presidenta:** Dra. Elizabeth Contreras López

**Secretaria:** Dra. Laura Berenice Olvera Rosales

**Vocal:** Dr. Luis Guillermo González Olivares

**Suplente:** Dr. Emmanuel Pérez Escalante

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

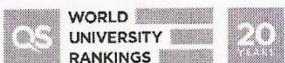
Atentamente  
 “Amor, Orden y Progreso”

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval  
 Director del ICBI



OAASYCC

Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184  
 Teléfono: 771 71 720 00 Ext. 2231 Fax 2109  
 direccion\_icbi@uaeh.edu.mx



# Índice

Resumen	i
1. Introducción	1
2. Marco Teórico	3
2.1 Hipertensión arterial	3
2.1.1 Principales mecanismos fisiopatológicos involucrados en el control de la presión arterial	3
2.2 Actividad antihipertensiva de proteínas alimentarias	5
2.2.1 Mecanismo de acción de la enzima convertidora de angiotensina	6
2.3 Bacterias ácido lácticas y su influencia en productos lácteos fermentados	8
2.4 Leches fermentadas: efecto en la salud humana	9
2.4.1 Diferencias en el sistema proteolítico de bacterias ácido lácticas y su relación con la producción de péptidos inhibidores de ECA en leches fermentadas	14
2.4.2 Estudios de producción de péptidos antihipertensivos en leches comerciales durante almacenamiento en refrigeración	16
3. Justificación	19
4. Objetivos	21
4.1 Objetivo general	21
4.2 Objetivos específicos	21
5. Metodología	22
5.1 Obtención de la muestra	22
5.1.1 Preparación de la muestra	22
5.2 Cuantificación de microorganismos viables	23
5.3 Determinación del pH y acidez titulable en las leches fermentadas comerciales	23
5.4 Cuantificación de péptidos solubles en las leches fermentadas	24
5.5 Electroforesis desnaturalizante de las leches fermentadas	25
5.6 Determinación de la capacidad antihipertensiva	26
5.7 Análisis estadístico	27
6. Resultados y discusiones	28
6.1 Cuenta viable	28
6.2 Análisis de pH y acidez titulable	30
6.3 Perfil proteolítico	31
6.3.1 Determinación de grupos amino libres pro TNBS	31
6.3.2 Separación de fracciones peptídicas por Tris-Glicina-SDS-PAGE	34
6.4 Determinación de la capacidad antihipertensiva: inhibición de la ECA	41
7. Conclusiones	44
8. Referencias bibliográficas	45

## Índice de figuras

Figura 1. Mecanismo de acción antihipertensiva. Sistema renina-angiotensina-aldosterona	7
Figura 2. Electroferograma de la separación de péptidos de leche fermentada LF1	35
Figura 3. Electroferograma de la separación de péptidos de leche fermentada LF2	36
Figura 4. Electroferograma de la separación de péptidos de leche fermentada LF3	37
Figura 5. Electroferograma de la separación de péptidos de leche fermentada LF4	38
Figura 6. Electroferograma de la separación de péptidos de leche fermentada LF5	39

## Índice de tablas

Tabla 1. Leches fermentadas comunes alrededor del mundo y sus cultivos iniciadores	11
Tabla 2. Beneficios a la salud de algunas leches fermentadas comerciales.	12
Tabla 3. Leches fermentadas comerciales con secuencias peptídicas de probado efecto antihipertensivo	17
Tabla 4. Leches fermentadas comerciales seleccionadas para el estudio	22
Tabla 5. Concentración de bacterias ácido lácticas expresada en log UFC/mL de leches fermentadas comerciales durante almacenamiento refrigerado a 4°C durante 21 días	29
Tabla 6. Comportamiento del pH y acidez (% ácido láctico) de leches fermentadas comerciales durante almacenamiento refrigerado a 4°C por 21 días	30
Tabla 7. Concentración de grupos amino libres (mg/L) de leches fermentadas comerciales durante almacenamiento refrigerado a 4°C por 21 días	32
Tabla 8. Actividad antihipertensiva de leches fermentadas comerciales medida por el porcentaje de inhibición de enzima convertidora de angiotensina (ECA) al inicio y al final de almacenamiento refrigerado	41

## Resumen

Las leches fermentadas han sido ligadas con beneficios a la salud desde hace varios años, tanto por las bacterias probióticas que contienen como por los metabolitos con actividad biológica que se producen durante la fermentación. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad microbiana y la capacidad antihipertensiva presente en cinco leches fermentadas comerciales, las cuales fueron mantenidas en refrigeración para evaluar posibles cambios en los dos parámetros previamente mencionados.

Se seleccionaron cinco muestras actualmente presentes en el mercado, de las cuales, cuatro contenían bacterias probióticas (LF1 a LF4), mientras que la restante sólo mantenía los cultivos iniciadores del yogurt (LF5). Las muestras fueron adquiridas con al menos 28 días de vida útil y se mantuvieron almacenadas a 4°C por 21 días, realizando un muestreo inicial y semanal para el análisis de viabilidad microbiana por recuento en agar MRS, actividad metabólica sobre fuentes de carbono a través de medición de pH y acidez, perfil proteolítico mediante la determinación de grupos amino libres y electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida, y determinación de la capacidad antihipertensiva mediante un ensayo *in vitro*.

En general se observó que la viabilidad microbiológica aumentó en el día 7 y se mantuvo constante hasta el día 21, con excepción de la muestra LF5 donde la viabilidad fue menor hacia el final del almacenamiento. En el caso de los parámetros de pH y acidez, éstos presentaron pequeños o nulos cambios durante el almacenamiento refrigerado, lo que denota una baja actividad metabólica de degradación de carbohidratos.

De forma similar, el análisis de aminos libres permitió establecer una tasa baja de consumo de fuentes de nitrógeno. No obstante, en la mayoría de las leches analizadas se encontró un patrón de degradación de caseínas y proteínas séricas que llevaron a la detección de péptidos menores a 10 KDa, con excepción de la muestra LF2, resultado que fue asociado al método electroforético empleado.

Respecto a la capacidad inhibitoria de ECA, las leches fermentadas mostraron una actividad superior al 80% en todos los casos, la cual se mantuvo sin cambios significativos hasta el final del almacenamiento. Esta capacidad de retención en la actividad antihipertensiva fue asociada a la baja acción proteolítica encontrada bajo refrigeración.

De esta forma se pudo determinar que todos los productos evaluados pueden ser consumidos en cualquier punto previo a la fecha de caducidad declarada y éstos otorgarán una acción biológica similar.

## 1. Introducción

Durante décadas, las leches fermentadas se han considerado productos benéficos para la salud, lo cual se ha atribuido a los microorganismos involucrados en la fermentación. Estudios recientes han comprobado que estos beneficios también se deben a los diferentes productos liberados durante el proceso de fermentación por microorganismos probióticos, tales como metabolitos y otras moléculas biológicamente activas (Sharifi-Rad *et al.*, 2020; Chugh y Kamal-Eldin, 2020; Figueroa-González *et al.*, 2010).

Los probióticos se han definido como organismos vivos que al ingerirse afectan benéficamente al huésped, mejorando el balance intestinal (Zendebodi *et al.*, 2020). Al modificar la microbiota intestinal, los probióticos influyen directa e indirectamente en el estado de la salud a través de producción de vitaminas y ácidos grasos de cadena corta, degradación de sustancias alimenticias no digeridas, estimulación de la respuesta inmune y protección frente a microorganismos enteropatógenos (Velez *et al.*, 2021; Olvera-Rosales *et al.*, 2021).

Una gran variedad de especies y géneros son considerados como probióticos potenciales. Sin embargo, de manera comercial las bacterias ácido lácticas (BAL) son las más importantes (Ayivi *et al.*, 2020). Adicionalmente, la capacidad proteolítica de las BAL juega un papel muy importante durante la fermentación de la leche, principalmente en el fraccionamiento de proteínas a péptidos y aminoácidos libres (Olvera-Rosales *et al.*, 2023; Brown *et al.*, 2017).

Algunos de los péptidos producidos presentan actividad biológica, por lo que son considerados péptidos bioactivos. A partir de leches fermentadas se han aislado numerosos péptidos con diversas actividades biológicas (Akbarian *et al.*, 2022; Olvera-Rosales *et al.*, 2022). De hecho, Olvera-Rosales *et al.* (2022) describieron el mecanismo de acción de péptidos con actividad inmunomodulante, anticancerígena, hipocolesterolemica, antimicrobiana, antioxidante, acarreadora de minerales, así como reguladora de actividad intestinal y del sistema nervioso, entre otras. No obstante, los péptidos bioactivos más estudiados hasta el momento son

aquellos implicados en el control de la presión arterial, inclusive mediante análisis de peptidómica (Chen *et al.*, 2021; Amorim *et al.*, 2019).

El primer reporte de una leche fermentada con actividad antihipertensiva comprobada fue producida con una combinación de *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae*, la cual contenía dos tripéptidos (VPP e IPP) que estuvieron asociados a la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (del Mar Contreras *et al.*, 2009). Lo anterior, permitió el desarrollo de diversas investigaciones con objetivos similares, demostrándose que diferentes géneros de bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* son capaces de producir una diversidad de péptidos bioactivos, entre ellos los antihipertensivos, liberándose tanto en el proceso de fermentación como durante el almacenamiento refrigerado (González-Olivares *et al.*, 2014; Hernández-Ledesma *et al.*, 2011).

Estudios recientes realizados por Rubak *et al.*, (2020) y Glazunova *et al.*, (2022) continúan marcando una tendencia en la producción y seguimiento de péptidos bioactivos antihipertensivos en leches fermentadas, por lo que el análisis de estas propiedades en productos alimenticios que se encuentran actualmente en el mercado representa la posibilidad de que éstos aporten beneficios adicionales para el consumidor, los cuales deben ser comprobados y dados a conocer.

Es por ello que el objetivo de este trabajo fue determinar la viabilidad de bacterias ácido lácticas presentes en leches fermentadas comerciales, así como comprobar la generación de péptidos antihipertensivos por la acción metabólica de estos microorganismos durante condiciones de refrigeración para determinar si los consumidores de estos productos pueden obtener algún beneficio hacia la salud sin importar el periodo de tiempo que sean adquiridos e ingeridos.

## **2. Marco teórico**

### **2.1 Hipertensión arterial**

Actualmente, la hipertensión es considerada un grave problema de salud pública a nivel mundial, ya que de acuerdo a un estudio llevado a cabo en el año 2019 por el “Globan Burden Disease” casi la mitad de la población adulta de Estados Unidos y Centroamérica padecen esta enfermedad. Adicionalmente, la elevación en la presión arterial sistólica ha llegado a ser considerada como la principal causa de decadencia de la calidad de vida en adultos, pues es considerado un factor de riesgo importante para diversas complicaciones cardiovasculares y renales, incluidos accidentes cerebrovasculares, insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal, aterosclerosis y demencia (Nonato *et al.*, 2021; Harrison *et al.*, 2021).

En México las estadísticas son muy similares, de acuerdo a la encuesta nacional de salud (ENSANUT) realizada en el año 2020, al menos un tercio de la población adulta presenta hipertensión arterial, sin embargo, lo más preocupante es que la mitad de estos adultos ignoraba su padecimiento (Nonato *et al.*, 2021).

Por lo anterior, es de vital importancia realizar una concientización efectiva en la población adulta de los riesgos que implica el padecer hipertensión para que, en primera instancia, se realice un diagnóstico correcto y pueda establecerse una terapia médica oportuna y adecuada.

#### **2.1.1 Principales mecanismos fisiopatológicos involucrados en el control de la presión arterial**

El control de la presión arterial está rodeado de diversos mecanismos fisiopatológicos bastante complejos, los cuales son capaces de brindar una homeostasis al sistema cardiovascular. Uno de los más importantes es el Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA), el cual desempeña un papel crucial en la regulación de la presión arterial al controlar el volumen de líquido y la resistencia vascular sistémica (Rossier *et al.*, 2017; Harrison *et al.*, 2021).

En este mecanismo, los riñones liberan renina en respuesta a la presión arterial baja o por la presencia de niveles bajos de sodio. Posteriormente, la renina actúa sobre el angiotensinógeno para formar angiotensina I, que luego se convierte en angiotensina II mediante la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La angiotensina II es un potente vasoconstrictor que aumenta la presión arterial al contraer los vasos sanguíneos y estimular la liberación de aldosterona, lo que provoca retención de sodio y agua (Harrison *et al.*, 2021).

Otros mecanismos fisiopatológicos importantes son, por ejemplo, la activación del sistema nervioso simpático, el cual puede aumentar la presión arterial a través de la vasoconstricción promovida por la liberación de norepinefrina. Así mismo, la disfunción endotelial puede contribuir a la hipertensión al afectar la vasodilatación y la vasoconstricción ya que se reduce la biodisponibilidad del óxido nítrico, el cual mantiene funciones vasodilatadoras (Rossier *et al.*, 2017).

Adicionalmente, existen otros dos mecanismos de control de la presión arterial que, aunque son menos comunes, no son menos importantes. El primero de éstos es conocido como hipertensión sensible a la sal, donde los niveles elevados de sal en la dieta pueden alterar el equilibrio del sodio, provocando un incremento en el volumen de líquido extracelular y de la resistencia vascular sistémica, especialmente en personas sensibles al consumo de sal (Rossier *et al.*, 2017; Harrison *et al.*, 2021).

El segundo mecanismo está asociado a una disfunción endotelial y daño vascular promovido por procesos inflamatorios y de estrés oxidativo, los cuales alteran las funciones endoteliales, generando vasoconstricción que contribuye al desarrollo y progresión de la hipertensión (Rossier *et al.*, 2017).

El poder comprender estos mecanismos fisiopatológicos específicos permite establecer estrategias para el control de la presión arterial, así como establecer la regulación de alguna de las rutas involucradas mediante el uso de proteínas alimentarias, como es el caso de la inhibición de la ECA mediante distintos péptidos de fuentes alimentarias.

## 2.2 Actividad antihipertensiva de proteínas alimentarias

Como se ha descrito anteriormente, la hipertensión arterial es un proceso multifactorial y la inhibición de la ECA es el mecanismo de acción más estudiado para su control. Esta capacidad inhibitoria ha sido determinada tanto en proteínas de origen animal como vegetal (Aluko, 2015), teniendo como ejemplos, la actividad antihipertensiva proveniente de péptidos de pescado (UG *et al.*, 2019), leche (Chen *et al.*, 2021), huevo (Liao *et al.*, 2019), amaranto (Nardo *et al.*, 2020; Ayala-Niño *et al.*, 2019), entre otras fuentes proteicas.

Esta función inhibitoria ejercida por proteínas alimentarias es debida a la presencia de péptidos bioactivos o funcionales, los cuales son secuencias de aminoácidos inactivas en el interior de la proteína precursora, pero capaces de ejercer una determinada actividad biológica tras su liberación, la cual puede ser llevada a cabo por distintos métodos, tales como la hidrólisis química, enzimática o mediante procesos fermentativos (Lönnerdal, 2004; Aluko, 2015).

Generalmente, los péptidos bioactivos mantienen un tamaño pequeño (0.4-2 kDa), están compuestos de 2 a 20 aminoácidos y normalmente son liberados durante el procesado industrial de los alimentos o bien, durante la digestión gastrointestinal, proveyendo una actividad biológica adicional a las funciones nutrimentales con las que ya cuentan (Vargas-Bello-Pérez, 2019).

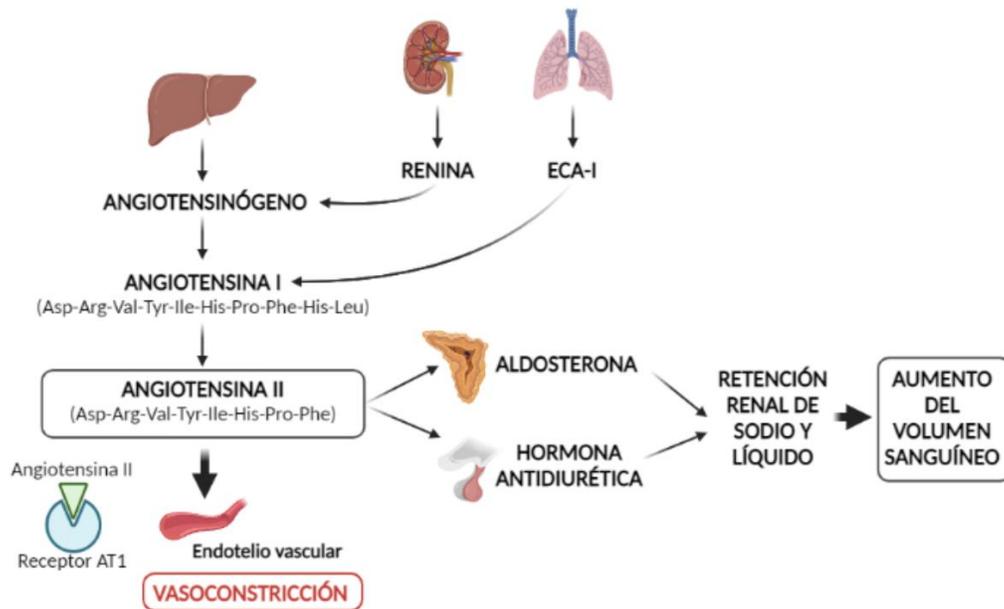
A pesar de que la inhibición de la ECA es uno de los mecanismos principales para el tratamiento de la hipertensión, otra de las enzimas involucradas en la regulación de la presión arterial es la enzima convertidora de endotelina (ECE), la cual cataliza la formación de endotelina-I a partir de su precursor inactivo denominado “big-ET-1” (Fernández-Musoles *et al.*, 2013). La endotelina-I resultante, es un potente vasoconstrictor, lo que incrementa la presión arterial. Por lo tanto, la inhibición de la ECE produce como consecuencia un efecto antihipertensivo. Hasta ahora, sólo se han descrito péptidos inhibidores de esta enzima a partir de un hidrolizado digestivo del pez bonito (Okitsu *et al.*, 1995), pero el alto contenido y variedad de proteínas

presentes en la leche podrían abrir un nuevo campo de estudio encaminado a la identificación de péptidos lácteos con acción inhibitoria sobre la ECE.

### **2.2.1 Mecanismo de acción de la enzima convertidora de angiotensina**

La ECA (EC 3.4.15.1) actúa en el sistema renina-angiotensina, hidrolizando la angiotensina-I, deca péptido inactivo, de secuencia DNVYIHPFHL, producido por la acción de la renina. La hidrólisis conduce a la liberación de la angiotensina-II y el dipéptido C-terminal Hys-Leu como se muestra en la figura 1 (Noe y Noe-Letschnig, 2021; Fitzgerald y Meisel, 2000).

La angiotensina-II es un compuesto de elevada potencia vasoconstrictora, provocando la contracción rápida de las arteriolas, y como consecuencia, incrementando la presión arterial. Además, la angiotensina-II estimula la secreción de aldosterona por las glándulas suprarrenales, hormona que induce la retención de sodio y agua, además de generar una mayor excreción de potasio. La acumulación de agua provoca el incremento del volumen extracelular (Noe y Noe-Letschnig, 2021), aumentando así la presión arterial y la neutralización de la producción de renina. Así también, la ECA actúa de manera simultánea en el sistema quinina-caliceína, catalizando la degradación de las bradiquininas (Schmieder *et al.*, 2007), compuestos de potente acción vasodilatadora, ocasionando también, un aumento en la presión arterial.



**Figura 1.** Mecanismo de acción antihipertensiva. Sistema renina-angiotensina-aldosterona. Tomado de Martínez-Mazzei (2022).

Debido a que la ECA se encuentra involucrada en distintos mecanismos que desencadenan un aumento en la presión arterial, su inhibición se vuelve clave para el tratamiento de la hipertensión, tal y como se ha demostrado en estudios con humanos y animales (Ferrairo *et al.*, 2005). De forma endógena se han identificado varios péptidos que actúan como inhibidores y sustratos competitivos de la ECA, tales como las encefalinas, las bradiquininas y la sustancia P, los cuales se encargan de regular la presión arterial. Mientras que, de forma exógena, uno de los primeros inhibidores estudiados para el control de la presión arterial fueron los extractos de veneno de serpiente *Bothrops jararaca*, los cuales mantienen un doble efecto, potencian la actividad de la bradiquinina (Lanzer *et al.*, 2007) e inhiben la ECA, funciones evaluadas tanto de forma *in vitro* como *in vivo*.

Un punto crucial en la inhibición de la ECA es la forma en que ésta se enlaza a los péptidos inhibidores y que se encuentra influenciada por la secuencia tripeptídica C-terminal de los mismos, haciendo que los péptidos puedan interactuar con tres regiones del centro activo de la ECA (Olvera-Rosales *et al.*, 2022). Así, los aminoácidos de carácter hidrofóbico, como triptófano, tirosina, fenilalanina o prolina,

favorecen la unión a estas zonas. En este mismo sentido, el péptido con secuencia C-terminal Phe-Ala-Pro y que es análogo al inhibidor encontrado en el extracto de veneno de serpiente, es uno de los más favorables para unirse al centro catalítico. Adicionalmente, la carga positiva del grupo guanidino o del grupo  $\epsilon$ -amino de la arginina o lisina, respectivamente, contribuyen a la potencia inhibidora (Cushman *et al.*, 1980); mientras que la presencia de aminoácidos dicarboxílicos en la secuencia peptídica o de prolina como penúltimo aminoácido disminuye o anula la actividad inhibitoria sobre la ECA (Olvera-Rosales *et al.*, 2022). Finalmente, el extremo N-terminal también influye en la actividad, de esta forma, la presencia de valina o de isoleucina en esta posición, incrementa la actividad antihipertensiva del péptido (Olalere *et al.*, 2023).

### **2.3 Bacterias ácido lácticas y su influencia en productos lácteos fermentados**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se distinguen por diversas características morfológicas, bioquímicas y metabólicas que las hacen esenciales para diversos procesos de fermentación de alimentos, incluida la producción de yogurt. Las BAL son bacterias Gram positivas, no formadoras de esporas con forma cocoide o de bastón (Leroy y De Vuyst, 2004; Ayivi y Abraham, 2022).

Metabólicamente, tienen la capacidad para fermentar carbohidratos produciendo ácido láctico como principal producto final si siguen la ruta metabólica homofermentativa o también CO<sub>2</sub>, etanol y acetato si siguen la ruta heterofermentativa. Normalmente, las BAL carecen de una cadena respiratoria funcional y generan energía a través de la fosforilación a nivel de sustrato (Bintsis, 2018; Ayivi y Abraham, 2022).

De esta forma, la actividad metabólica de las BAL propicia diversos efectos fisicoquímicos, tecnológicos, sensoriales y funcionales sobre los productos donde son utilizadas como cultivos iniciadores. Por ejemplo, estas bacterias son capaces de disminuir el pH del medio donde se desarrollan a partir de la producción de ácido

láctico, creando así, un ambiente hostil para algunos otros microorganismos indeseables (Leroy y De Vuyst, 2004; Ayivi y Abraham, 2022).

Desde el punto de vista sensorial y tecnológico, las BAL pueden contribuir al perfil de aroma y sabor de los alimentos fermentados a través de la producción de metabolitos como el diacetilo, la acetoína y el acetaldehído, además de otros compuestos volátiles y ácidos orgánicos que, en conjunto, contribuyen al perfil sensorial y sabor único de los alimentos fermentados. Así también, las bacterias ácido lácticas pueden producir exopolisacáridos durante la fermentación lo cual influye en la viscosidad y las propiedades de retención de agua, modificando la textura y la sensación en boca (Bintsis, 2018; Ayivi y Abraham, 2022).

Por otro lado, las BAL pueden ser partícipes en la generación de características funcionales de los alimentos donde son introducidos para llevar a cabo su acción metabólica. La principal actividad funcional que ejercen este tipo de bacterias es la propiedad probiótica que algunas cepas de BAL poseen. Así mismo, durante el desarrollo metabólico de estas bacterias se pueden producir vitaminas y péptidos bioactivos, además de reducir ciertos factores antinutricionales en los alimentos mediante el incremento en la biodisponibilidad de nutrientes y aumento de la digestibilidad de los mismos (Leroy y De Vuyst, 2004; Bintsis, 2018; Ayivi y Abraham, 2022).

Es así que, el metabolismo de las bacterias del ácido láctico influye significativamente en la calidad, la seguridad y las propiedades promotoras de la salud de los alimentos fermentados. Comprender y manipular el metabolismo de las BAL es esencial para optimizar la producción de productos fermentados con características deseables.

## **2.4 Leches fermentadas: efecto en la salud humana**

La fermentación de la leche para la elaboración de diferentes productos es una práctica muy antigua, la cual se originó sin intención durante el almacenamiento del alimento líquido. Durante estas fermentaciones se acumulan metabolitos como el

ácido láctico, el etanol y muchos otros que conservan a la leche y le imparten características organolépticas distintas (García-Garibay *et al.*, 1993).

La investigación sobre leches fermentadas ha crecido intensamente en los últimos veinte años. En algunos casos, se ha demostrado que las leches fermentadas tienen efectos probióticos debido a que su consumo lleva a la ingestión de grandes cantidades de bacterias vivas que ejercen beneficios en la salud, los cuales van más allá de la nutrición básica (Korshidian *et al.*, 2020; Santiago-López *et al.*, 2015). Últimamente, la investigación científica ha florecido poniendo interés en los temas que van desde los efectos antimicrobianos hasta la reducción del riesgo de cáncer que procede del consumo de leches fermentadas como el yogurt (Savaiano y Hutkins, 2021).

De acuerdo a diferentes investigaciones sobre leches fermentadas, el beneficio más comprobado sobre la salud, es el hecho de que los individuos con deficiencia de lactasa digieren mejor la lactosa a partir de leche fermentada que de leche fresca (Ibrahim *et al.*, 2021; Solomons, 2002). Este efecto se relaciona con las bacterias vivas, con su contenido enzimático (por ejemplo con la  $\beta$ -galactosidasa) y con la textura del producto. En la tabla 1 se muestran diferentes leches fermentadas consumidas alrededor del mundo y los microorganismos implicados en su producción.

Algunas leches fermentadas reducen la duración de ciertos tipos de diarreas, especialmente en niños (Hadjimbei *et al.*, 2022; Savainao y Hutkins, 2021). De igual forma, se ha demostrado el mejoramiento de ciertos parámetros del sistema inmunitario en modelos *in vitro* (Mendez *et al.*, 2021; Galdeano *et al.*, 2009; LeBlanc *et al.*, 2002). En un estudio en humanos se encontró un mejoramiento en los síntomas clínicos de la alergia nasal (Ishida *et al.*, 2005). Otros estudios han demostrado que el consumo de bacterias del yogurt deriva en el incremento de linfocitos B y de las células asesinas (Kaur *et al.*, 2022). Además, se ha observado que péptidos derivados de fermentación de leche pueden actuar como inmunomodulantes debido a su afinidad por los receptores opiáceos presentes en las células T y en los leucocitos fagocíticos humanos (Clare y Swaisgood, 2000).

**Tabla 1.** Leches fermentadas comunes alrededor del mundo y sus cultivos iniciadores.

Leche fermentada	Cultivo iniciador	País
<b>Kefir</b>	<i>L. casei</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> , <i>Leuconostoc</i> subsp. <i>cremoris</i>	Irán, España, Rusia
<b>Koumiss</b>	<i>L. acidophilus</i> , <i>Saccharomyces</i>	Rusia, Mongolia
<b>Leche acidophilus</b>	<i>L. acidophilus</i>	Diferentes países
<b>Leche bifidus</b>	<i>B. bifidum</i> y <i>B. longum</i>	Diferentes países
<b>Leche acidophilus-bifidus</b>	<i>L. acidophilus</i> y <i>Bifidobacterium</i> ssp.	Diferentes países
<b>Mil-Mil</b>	<i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> y <i>L. acidophilus</i>	Japón
<b>Yakult</b>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> Shirota	Japón
<b>Viili</b>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> subps. <i>cremoris</i>	Finlandia
<b>Dahi</b>	<i>L. paracasei</i> , <i>Lact. lactis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. cremoris</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>L. fermentum</i>	India, Nepal, Sri Lanka, Bangladesh, Pakistan
<b>Amasi</b>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (dominante), <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> y <i>Leuconostoc</i>	Sudáfrica, Zimbabue
<b>Somar</b>	<i>L. paracasei</i> , <i>Lact. lactis</i>	India, Nepal

Tomado de Korshidian *et al.* (2020)

Por otro lado, un estudio epidemiológico francés, mostró que las personas que consumen leches fermentadas tienen un riesgo menor para desarrollar grandes adenomas colorectales (Boutron *et al.*, 1996). Además, el consumo de yogurt en sujetos de edad avanzada con gastritis atrófica reduce la nitroreductasa y la azoreductasa, enzimas fecales procarcinógenas (Duque-Buitrago *et al.*, 2023; Pedrosa *et al.*, 1995). Después de estos estudios se han desarrollado investigaciones que están relacionadas con péptidos bioactivos provenientes de leches fermentadas y su efecto en cáncer (Samtiya *et al.*, 2022; Cakir y Tunali-Akbay, 2021).

Además de los beneficios anteriormente citados, las leches fermentadas son excelentes vehículos para el transporte y conservación de probióticos (Korshidian

et al., 2020), los cuales actúan como fábricas generadoras de diferentes metabolitos y compuestos bioactivos que impactan directamente al ser humano cuando se encuentran contenidos en las leches fermentadas consumidas (Tabla 2), teniendo así, una contribución adicional a los beneficios generales del consumo de productos fermentados.

**Tabla 2.** Beneficios a la salud de algunas leches fermentadas comerciales.

<b>Leche fermentada</b>	<b>Cultivo iniciador</b>	<b>Beneficios</b>
<b>Yogurt (Probiótico)</b>	<i>L. rhamnosus</i>	Inmunomodulatorio Tratamiento para personas con VIH
<b>Yogurt</b>	<i>S. thermophilus</i> y <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Predominancia de ácidos grasos de cadena corta
<b>Ayran</b>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> y <i>L. casei</i> subsp. <i>pseudoplantarum</i>	Abundancia de exopolisacáridos fácilmente digeribles
<b>Koumiss</b>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> y <i>S. thermophilus</i>	Antialérgico
<b>Maasai</b>	<i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. acidophilus</i> y <i>L. paracasei</i>	Prevención de diarreas. Efecto digestivo
<b>Kefir</b>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. amylovorous</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. galinarium</i> , <i>L. gasseri</i> y <i>L. johnsonii</i>	Previene la intolerancia a la lactosa. Antihipertensivo
<b>Yakult</b>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> Shirota	Transporte de probióticos
<b>Amasi</b>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (dominante), <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> y <i>Leuconostoc</i>	Antihipertensivo
<b>Somar</b>	<i>L. paracasei</i> y <i>L. lactis</i>	Inmunomodulatorio

Tomado de Sharma *et al.* (2023)

Se ha reportado también que los probióticos producen vitaminas tales como folato, riboflavina, cobalamina, vitamina K y tiamina (Chugh y Kamal-Eldin, 2020). Varias especies de bifidobacterias son capaces de producir folato, particularmente especies de *B. adolescentis* y *B. pseudocatenulatum*. De igual manera, este

metabolito es producido por especies de lactobacilos tales como *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Linares *et al.*, 2017).

En el mismo contexto, Khalili *et al.* (2020) investigaron la producción de folato en leche fermentada conteniendo diferentes probióticos durante 21 días de almacenamiento. Se observó que la mayor concentración de folato (1.5 mg/L) fue producida por *L. plantarum* 15HN después de 7 días. En otro estudio, la producción de folato ha sido reportada en una leche fermentada con *S. thermophilus* y *L. plantarum* 16cv, alcanzando una concentración de 321 ng/mL (Cucick *et al.*, 2020). Además, se sabe que especies como *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* y *B. longum*, *Propionibacterium* y *L. reuteri* son productoras de vitamina B<sub>12</sub> (Melini *et al.*, 2019).

Otro de los beneficios de la fermentación de la leche es la liberación de péptidos bioactivos, los cuales pueden presentar propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antitrombóticas, inmunomoduladoras y funciones antihipertensivas (Karami y Akbari-Adergani, 2019). En este sentido, se ha reportado la producción de péptidos bioactivos en leche fermentada producida por cepas de *L. plantarum* (Aguilar-Toalá *et al.*, 2017), por *L. rhamnosus* PRA331 y *L. casei* PRA205 (Rutella *et al.*, 2016), por *L. casei* ATCC 393 (Abdel-Hamid *et al.*, 2019), leche de oveja fermentada por granos de kéfir (de Lima *et al.*, 2018) y leche de cabra fermentada por *L. plantarum* C4 (Moreno-Montoro *et al.*, 2017).

Del mismo modo, la hidrólisis mixta de la kappa caseína ( $\kappa$ -CN) de la leche con *Lactobacillus rhamnosus* GG seguido de una digestión con tripsina y pepsina, dio como resultado un péptido que aumenta la respuesta mitogénica de linfocitos humanos en cultivos celulares (Philanto-Leppälä *et al.*, 1993). Así también, investigaciones posteriores demostraron que los péptidos producidos por este microorganismo tenían la capacidad de favorecer la proliferación de linfocitos en un modelo intestinal (Meisel, 2004). Recientemente, se ha estudiado la capacidad de liberación de fracciones peptídicas con capacidad antioxidante y antihipertensiva después de la fermentación de leche con esta misma cepa bacteriana (Begunova *et al.*, 2020).

Es importante destacar que la fermentación de leche por bacterias ácido lácticas genera una cantidad importante de péptidos que además se conservan durante el proceso digestivo (Ali *et al.*, 2022; Meisel y Fitzgerald, 2000). En un estudio realizado con leche UHT fermentada con *L. rhamnosus* GG, se observó la liberación de péptidos después de que la leche fermentada se sometió a una digestión *in vitro* con pepsina y tripsina. Las fracciones producidas durante la fermentación se separaron mediante cromatografía preparativa y se analizaron con espectrofotometría de masas; el análisis reveló ocho péptidos liberados, dos de éstos con actividad inmunoestimulante, cuatro con actividad opiácea y dos como inhibidores de la ECA (Rokka *et al.*, 1997).

Otros ejemplos de la producción de péptidos bioactivos en leches fermentadas son aquellos péptidos antihipertensivos obtenidos con *L. helveticus*, ya sea por una inoculación individual o mediante la inoculación simultánea con *S. cerevisiae* (Das y Hati 2022; Meisel, 2004). Finalmente, en revisiones recientes, se ha demostrado la importancia de las proteínas de leche como fuente de péptidos bioactivos, tanto de caseínas como séricas (Escamilla-Rosales *et al.*, 2023; Olvera-Rosales *et al.*, 2022; Guha *et al.*, 2021; Vargas-Bello *et al.*, 2019).

#### **2.4.1 Diferencias en el sistema proteolítico de bacterias ácido lácticas y su relación con la producción de péptidos inhibidores de ECA en leches fermentadas**

Las bacterias ácido lácticas poseen enzimas proteolíticas capaces de hidrolizar las proteínas lácteas liberando péptidos y aminoácidos que son utilizados como fuente de nitrógeno, esenciales para su desarrollo (Olvera-Rosales *et al.*, 2023). Además, estos péptidos liberados durante el proceso de fermentación, pueden ejercer distintas actividades biológicas que contribuyen a las propiedades benéficas atribuidas a los productos lácteos fermentados y a las propias bacterias ácido lácticas (Chai *et al.*, 2020).

Algunos de los péptidos liberados tras la acción de los microorganismos durante la fermentación de la leche, pueden ejercer una actividad inhibitoria sobre la ECA, por

lo que se ha sugerido que los productos fermentados, podrían ser empleados en la prevención y el tratamiento de la hipertensión (Aaslam *et al.*, 2019). Sin embargo, los resultados de los estudios difieren de unos autores a otros. Se ha observado que la acción de los fermentos es decisiva, por lo que las características del producto final dependerán del cultivo iniciador empleado en el proceso de fermentación (Matar *et al.*, 2000; Clare y Swaisgood, 2000; Korhonen y Pihlanto-Lepälä, 2006).

Tanto las bacterias ácido lácticas empleadas como cultivo iniciador, así como la microbiota endógena de la leche poseen un sistema proteolítico constituido por proteinasas unidas a la pared celular y peptidasas intracelulares (Olvera-Rosales *et al.*, 2023; Rodríguez-Serrano *et al.*, 2018). Durante el procesado y almacenamiento de los productos fermentados, las proteinasas son capaces de hidrolizar las proteínas del alimento para generar oligopéptidos (Poolman *et al.*, 1995; Juille *et al.*, 2005).

De esta forma, los di- tri- y oligopéptidos de menor tamaño pueden ser transportados hasta el interior de la célula mediante sistemas específicos de transporte de la bacteria, donde las peptidasas de la membrana plasmática los hidrolizan, formándose péptidos de menor tamaño y aminoácidos libres. Además, los péptidos de mayor tamaño que no pueden ser transportados al interior de la célula, también pueden ser fuente de péptidos bioactivos tras su degradación por las peptidasas intracelulares liberadas durante la lisis celular (Poolman *et al.*, 1995; Law y Haandrikman, 1997). Los péptidos originados contribuyen, por tanto, al cambio en las propiedades reológicas, sensoriales y biológicas del producto fermentado (Olvera-Rosales *et al.*, 2023).

Sin embargo, Meisel y Bockelmann, (1999) reportaron que durante la elaboración de las leches fermentadas y debido a la breve duración del proceso y a la especificidad de las enzimas peptidásicas, es poco probable la liberación de péptidos bioactivos. La actividad proteolítica de las bacterias lácticas es baja y solo provoca la hidrólisis del 1-2% de las proteínas de la leche durante el proceso de elaboración del yogurt (Perdigon *et al.*, 1991). Otros autores han descrito la

capacidad de las proteinasas de las bacterias lácticas para hidrolizar más del 40% de los enlaces peptídicos de las caseínas (Juillard *et al.*, 1995; Kunji *et al.*, 1996; Mierau *et al.*, 1997, Juille *et al.*, 2005), generando un gran número de péptidos, los cuales podrían ser degradados por el sistema peptidásico para la liberación de péptidos bioactivos. La discrepancia entre estos se debe a la dependencia del grado de proteólisis en función del microorganismo empleado en cada estudio (Marshall y Tamime, 1997, Olvera-Rosales *et al.*, 2023), así como de las condiciones del proceso de fermentación.

Las diferencias en el sistema proteolítico de *Lactobacillus helveticus* provoca por ejemplo, que esta bacteria posea mayor actividad proteolítica sobre las proteínas lácteas que otras bacterias ácido lácticas, en consecuencia, la concentración de péptidos antihipertensivos de la leche fermentada por esta bacteria es mayor (Leclerc *et al.* 2002). Es a partir de esta leche fermentada que Yamamoto *et al.*, (1999) han aislado el péptido de secuencia YP probablemente originado de la caseína.

Más recientemente, se han aislado otros péptidos inhibidores de la ECA formados a partir de caseinas beta y kappa durante la fermentación de la leche con *L. helveticus* NK1 (Begunova *et al.*, 2020) aunque microorganismos como *Lactobacillus rhamnosus* GG (Sebastián-Nicolás *et al.*, 2021), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Chen *et al.*, 2021) y *Enterococcus faecalis* (Quirós *et al.*, 2007) también han demostrado su capacidad para liberar péptidos inhibidores de ECA encriptados en secuencias de proteínas lácteas.

#### **2.4.2 Estudios de producción de péptidos antihipertensivos en leches comerciales durante almacenamiento en refrigeración**

A medida que la hipertensión continúa aumentando en todo el mundo, la búsqueda y producción de alimentos funcionales antihipertensivos también ha aumentado. Hay varios productos lácteos fermentados en el mercado, incluidos Ameal (Calpis Co., Tokio, Japón), Calpis (Calpis Co.), Evolus (Valio, Helsinki, Finlandia), entre

otros (Tabla 3). Aunque estos productos atribuyen su efecto antihipertensivo a los péptidos bioactivos presentes en la leche fermentada, también contienen minerales como el potasio y el calcio, que han demostrado tener un efecto positivo sobre la presión arterial (Beltrán-Barrientos *et al.*, 2016).

**Tabla 3.** Leches fermentadas comerciales con secuencias peptídicas de probado efecto antihipertensivo.

<b>Leche fermentada comercial</b>	<b>Descripción del producto</b>	<b>Secuencia de Péptidos antihipertensivos</b>
<b>Ameal S Calpis Co. (Tokio, Japón)</b>	Leche fermentada con <i>L. helveticus</i> y <i>S. cerevisiae</i> que contiene tripéptidos inhibidores de ECA	Val-Pro-Pro Ile-Pro-Pro
<b>Calpis Calpis Co.</b>	Leche fermentada con <i>L. helveticus</i> y <i>S. cerevisiae</i> que contiene tripéptidos inhibidores de ECA	Val-Pro-Pro Ile-Pro-Pro
<b>Danaten Danone (París, Francia)</b>	Leche fermentada con <i>L. helveticus</i> DN-119905 que contiene tripéptidos inhibidores de ECA	No reportados
<b>Evolus2 Valio (Helsinki, Finland)</b>	Leche fermentada con <i>L. helveticus</i> LBK-16H que contiene tripéptidos inhibidores de ECA	Val-Pro-Pro Ile-Pro-Pro

Tomado de Beltrán-Barrientos *et al.* (2016)

Actualmente, no se han reportado estudios de la producción de péptidos con capacidad antihipertensiva en leches comerciales durante su almacenamiento refrigerado. Sin embargo, algunos estudios si han dado cuenta de la producción de péptidos en este tipo de productos lácteos. González-Olivares *et al.* (2011), realizaron un estudio con el objetivo de determinar la concentración y el perfil de pesos moleculares de los péptidos encriptados en las proteínas de siete leches comerciales que fueron liberados por la actividad proteolítica de bacterias ácido lácticas durante su almacenamiento refrigerado.

Los autores encontraron que la concentración y diversidad de péptidos depende del microorganismo que fermenta la leche. Además, el peso molecular de los péptidos hallados se comparó con los reportados en la literatura como péptidos bioactivos,

encontrando varias semejanzas, por lo que se incrementa la probabilidad de tener péptidos de importancia fisiológica en leches fermentadas comerciales.

En el año 2014, González-Olivares *et al.* realizaron un estudio similar, pero en una leche comercial elaborada con un microorganismo probiótico. Estos autores separaron dos fracciones inferiores a 2 kDa con aminoácidos aromáticos en su estructura. Estos resultados fueron consistentes con los informados para estructuras de péptidos con actividad antihipertensiva. Por lo tanto, la presencia de aminoácidos aromáticos en las fracciones peptídicas obtenidas aumenta la probabilidad de encontrar péptidos con tal actividad en leches fermentadas comerciales almacenadas en refrigeración.

Es así que, durante el almacenamiento en frío se liberan péptidos con diferentes pesos moleculares. Esto podría deberse a la acción de proteinasas y peptidasas del sistema proteolítico en bacterias ácido lácticas. Además de que este tipo de estudios abren la posibilidad de realizar estudios más profundos para comprobar la capacidad antihipertensiva de péptidos contenidos en leches fermentadas comerciales.

### **3. Justificación**

La hipertensión es un grave problema de salud pública, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, existen alrededor de 1280 millones de adultos padeciendo esta patología a nivel mundial, sin embargo, menos de la mitad de esta población es diagnosticada y tratada. Por lo anterior, la hipertensión es el factor principal para el desencadenamiento de otras enfermedades cardiovasculares y a su vez, es considerada una de las causas principales de muerte prematura.

De acuerdo a estadísticas nacionales, se estima que en México existen 30 millones de personas que viven con hipertensión, pero lo más preocupante es que casi la mitad de ellos desconoce que sufre esta patología. Además, se sabe que alrededor de 50 mil fallecimientos anuales se encuentran relacionados con esta enfermedad.

Una de las estrategias actuales para la prevención y/o tratamiento de enfermedades cardiovasculares ha sido la inclusión de alimentos funcionales. De esta forma, se ha propuesto incluir ingredientes bioactivos en la dieta de personas que presentan una predisposición al incremento de la presión arterial o que ya la tienen y desean incorporar una fuente alternativa de tratamiento.

En este sentido, los probióticos son uno de los ingredientes funcionales con mayor ingesta y reconocimiento acerca de sus beneficios por parte de la población, siendo consumidos principalmente en productos lácteos fermentados. Si bien es cierto que, las bacterias probióticas que se encuentran presentes en estos productos no ejercen un efecto directo sobre el control de la hipertensión, su acción metabólica puede generar componentes que son capaces de generar una disminución en la presión arterial a partir de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina, como es el caso de los péptidos antihipertensivos.

Por lo anterior, cobra gran relevancia determinar si los productos que se encuentran actualmente en el mercado y que son de la preferencia de los consumidores presentan alguna función biológica adicional que beneficie a la salud. Es así que, el análisis de la capacidad antihipertensiva de leches fermentadas de consumo

habitual se convierte en una oportunidad para dar a conocer otros beneficios asociados a este tipo de productos y que son desconocidos hasta el momento.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Analizar la concentración de bacterias ácido lácticas y la capacidad inhibitoria de ECA de leches fermentadas comerciales almacenadas en refrigeración a través de técnicas microbiológicas y ensayos *in vitro* para identificar su potencial bioactivo.

### 4.2 Objetivos específicos

- Evaluar las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de leches fermentadas comerciales durante su almacenamiento en refrigeración a partir de la medición de pH, acidez titulable y conteo de bacterias ácido lácticas con la finalidad de determinar cambios originados por el metabolismo de cultivos iniciadores.
- Identificar la actividad metabólica sobre el contenido proteico presente en las leches fermentadas durante su almacenamiento en refrigeración mediante técnicas espectrofotométricas y de separación para establecer asociaciones entre la proteólisis generada y su capacidad para inhibir la ECA.
- Determinar la actividad antihipertensiva de leches fermentadas en dos diferentes estadios del periodo de almacenamiento mediante un ensayo *in vitro* de inhibición con la finalidad de establecer si el tiempo de consumo es una variable de influencia.

## 5. Metodología

### 5.1 Obtención de la muestra

Se emplearon 5 leches fermentadas comerciales identificadas en la Tabla 4. Los productos se seleccionaron de acuerdo a los microorganismos utilizados como cultivo iniciador y que son declarados en la etiqueta. Se tomó en consideración la capacidad probiótica de éstos (muestras de LF1 a LF4) y la exclusividad en el contenido de cepas específicas utilizadas para la fabricación del yogurt (muestra LF-5). Los productos fueron adquiridos en supermercados locales bajo las condiciones de punto de venta, asegurándose que éstos fueran del mismo lote y se encontraran al menos a 28 días de la fecha de caducidad declarada.

**Tabla 4.** Leches fermentadas comerciales seleccionadas para el estudio

Leche fermentada	Cultivo iniciador
LF1	<i>L. casei</i> DN-114001, <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>S. thermophilus</i>
LF2	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> Shirota
LF3	<i>L. casei</i>
LF4	<i>L. acidophilus</i>
LF5	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>S. thermophilus</i>

#### 5.1.1 Preparación de las muestras

Las leches fermentadas se almacenaron a 4°C durante 21 días, realizando el muestreo con un producto nuevo al día 0, 7, 14 y 21. Durante los muestreos, se separó 1 mL de cada leche fermentada comercial para realizar el análisis microbiológico, mientras que otros 5 mL se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante obtenido fue congelado a -18°C hasta su uso en determinaciones posteriores.

## 5.2 Cuantificación de microorganismos viables

Con la finalidad de determinar la viabilidad de las bacterias ácido lácticas presentes en cada leche fermentada comercial al momento de su adquisición y durante el almacenamiento refrigerado se realizó un recuento en placa por la técnica de microgota (Miles y Misra, 1938). El recuento se realizó inmediatamente después que las muestras fueron obtenidas y a los 7, 14 y 21 días de almacenamiento. Se usó agar MRS, el cual se preparó según las indicaciones del proveedor y se esterilizó a 121°C durante 15 min.

Se tomaron alícuotas de 100 µL de cada muestra de leche comercial y se procedió a realizar 8 diluciones decimales consecutivas. Posteriormente, se colocaron 5 µL de cada dilución en una placa Petri (previamente divididas en cuatro partes) conteniendo agar MRS. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C y transcurrido este tiempo, se contó el número de unidades formadoras de colonias presentes en cada dilución sembrada. La concentración de bacterias ácido lácticas se reportó como log UFC/mL a partir de la aplicación de la siguiente ecuación:

$$\log \text{UFC/mL} = \log_{10} (C \cdot 10^X \cdot Y)$$

Donde:

C es el número de colonias contadas,  $10^X$  el inverso de la dilución y Y el factor de dilución determinado por el cociente del volumen reportado en la concentración (1 mL) entre el volumen inoculado (0.005 mL).

## 5.3 Determinación del pH y acidez titulable en las leches fermentadas comerciales

La medición del pH de cada una de las muestras se realizó de forma directa sobre 5 mL de cada leche fermentada utilizando un potenciómetro Conductronic pH120 previamente calibrado con soluciones buffer a pH 4 y 7 (Olvera-Rosales *et al.*, 2023). En el caso de la acidez titulable, este parámetro fue determinado mediante

una valoración ácido-base utilizando NaOH 0.1 N como agente titulante y fenolftaleína como indicador (Olvera-Rosales *et al.*, 2023). El volumen de muestra analizada fue de 3 mL y se calculó el porcentaje de ácido láctico presente en cada leche fermentada a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Acidez titulable (\% de ácido láctico)} = \frac{(\text{Volumen gastado de NaOH})(0.009)}{\text{Volumen de muestra}} \times 100$$

#### **5.4 Cuantificación de péptidos solubles en las leches fermentadas**

Se realizó el análisis de la concentración de grupos aminos libres por medio del método del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS), el cual está basado en la reacción de este ácido con grupos amino primarios para formar un complejo con un máximo de absorción a los 340 nm (Spellman *et al.*, 2003).

Se preparó una solución amortiguadora de fosfatos 0.21 M con un pH de 8.2 y reactivo TNBS al 0.1% disuelto en el mismo buffer. Se agregaron 2 mL de solución amortiguadora, 250 µL de muestra y 2 mL de reactivo TNBS a tubos de ensaye forrados con papel aluminio debido a la fotosensibilidad de la reacción y la mezcla se agitó en vórtex durante 30 segundos. A la par, se preparó un sistema blanco con las mismas cantidades de solución amortiguadora y disolución de TNBS pero donde se agregó agua desionizada en lugar de muestra.

Tanto el blanco como las muestras se incubaron por una hora a 50°C y pasado este tiempo, la reacción se detuvo adicionando 4 mL de HCl 0.1 N. Finalmente, el blanco y las muestras se colocaron en un baño con hielo durante 5 minutos, para después, medir su absorbancia en celdas de cuarzo a 340 nm. La concentración de grupos amino libres se determinó a partir de una curva de calibración realizada con glicina a concentraciones de 0, 25, 50, 100, 150 y 200 mg/L, la cual presentó un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.9963 y la siguiente ecuación de la recta:  $y = 0.0046x + 0.0139$ .

## 5.5 Electroforesis desnaturalizante de las leches fermentadas

Se realizó la electroforesis desnaturalizante Tris-Glicina-SDS-PAGE a un 15% de T para el caso del gel de separación y un 4% de T para el gel de concentración de acuerdo al procedimiento reportado por Laemmli (1970). Para lograr lo anterior, 7.5 mL de acrilamida 37.5:1 (Bio-Rad) se colocaron en un matraz volumétrico de 10 mL y se aforó con agua desionizada con la finalidad de obtener acrilamida al 30%.

Posteriormente, 4 mL de la disolución anterior fueron mezclados en un matraz Kitazato junto con 4 mL de buffer Tris-HCl 1.5 M a pH=8.8 y 80  $\mu$ L de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%, el cual fue disuelto en agua. La mezcla anterior fue desgasificada mediante vacío por 15 min, para después, adicionarle 40  $\mu$ L de persulfato de amonio al 10% disuelto en buffer pH= 8.8 y 4  $\mu$ L de tetrametiletilendiamina (TEMED). El contenido total del matraz fue homogenizado manualmente y trasladado al equipo de electroforesis para generar dos geles de separación, los cuales fueron compactados con agua desionizada y se permitió su polimerización por 2-3 h.

En el caso del gel de concentración, éste fue preparado de forma similar al gel de separación, donde 550  $\mu$ L de la acrilamida al 30% preparada previamente se mezclaron con 3.45 mL de buffer Tris-HCl 0.5 M a pH=6.8 y con 40  $\mu$ L de SDS al 10%. La mezcla anterior se desgasificó bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, para después adicionar 20  $\mu$ L de persulfato de amonio al 10% disuelto en buffer pH= 6.8 y 3  $\mu$ L de TEMED.

La mezcla resultante se homogenizó de forma manual y el contenido fue trasladado al equipo de electroforesis que contenía previamente los dos geles de separación, desechando el agua que los mantenía compactados para que el gel de concentración ocupara su lugar. Finalmente, los peines que formaron los carriles de inyección fueron colocados antes de que el gel comenzara a polimerizar.

Previo a su inyección en los carriles del gel de concentración, las muestras fueron tratadas de la siguiente forma: 40  $\mu\text{L}$  de éstas fueron mezcladas con 20  $\mu\text{L}$  de buffer colorante y 3  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol, para posteriormente, ser calentadas a  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 min. Transcurrido el tiempo, las muestras se dejaron enfriar por 5 min y 15  $\mu\text{L}$  de éstas se inyectaron en cada uno de los carriles que habían sido hidratados con buffer de corrida a  $\text{pH}=8.3$ . Así también, se inyectaron en un carril diferente 15  $\mu\text{L}$  de estándar Precision Plus Protein Dual Color (Bio-Rad) con pesos moleculares entre 10 y 250 kDa con la finalidad de obtener los pesos moleculares en las muestras analizadas. Al finalizar la inyección, la electroforesis se llevó a cabo a 200 V en un baño de hielo hasta que las muestras migraron en su totalidad al frente del gel (60-90 min).

Al término de la electroforesis, los geles fueron sometidos a un proceso de fijación por 1 h en ácido acético al 7.5% (v/v), seguido de un proceso de revelado en solución comercial de azul de Comassie (Bio-Helix) por una hora más y por un proceso de desteñido en agua desionizada por una hora adicional. Finalmente, los geles fueron analizados mediante el sistema Gel-Doc (Bio-Rad) y los pesos moleculares de cada fracción separada fueron calculados utilizando como referencia el estándar de pesos moleculares previamente mencionado.

## **5.6 Determinación de la capacidad antihipertensiva**

La actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina se determinó por la medición espectrofotométrica de la formación de ácido hipúrico a partir de la hidrólisis del sustrato hipuril-histidil-leucina (HHL) usando el método descrito por Cushman *et al.* (1971) con algunas modificaciones.

Se generaron dos sistemas de reacción, el primero denominado control positivo ( $A_{100}$ ) y que contenía 80  $\mu\text{L}$  de buffer de boratos (0.05 M,  $\text{pH}=8.2$  con 0.3 M de NaCl), 200  $\mu\text{L}$  de HHL a 5 mM disuelto en el mismo buffer y 20  $\mu\text{L}$  de enzima convertidora de angiotensina de pulmón de conejo a 0.1 U/ml disuelto también en buffer de boratos. El segundo sistema ( $A_m$ ) consistió en las mismas cantidades de

sustrato y enzima que en el sistema control, pero donde los 80 µL de buffer de boratos fueron sustituidos por cada una de las leches fermentadas comerciales. Ambos sistemas de reacción fueron incubados a 37°C por 80 min y transcurrido el tiempo, la reacción fue terminada mediante la adición de 250 µL de HCl 0.1 M.

Posteriormente, el contenido total de los sistemas de reacción fue trasladado a tubos de ensaye y se les adicionaron 1.7 mL de acetato de etilo para realizar tres extracciones del ácido hipúrico generado. Una vez terminada la extracción, 800 µL de la fase orgánica se colocaron en microviales y se evaporó el solvente hasta sequedad por 1 h a 80°C. El producto obtenido fue reconstituido con 500 µL de agua desionizada y se le adicionaron 300 µL y 150 µL de piridina y cloruro de bencensulfonilo, respectivamente. La mezcla fue homogenizada primero por inversión manual por el calor generado y luego con vortex para finalmente obtener su absorbancia a 410 nm utilizando agua desionizada como blanco.

El porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(A_{100} - A_m)}{A_{100}} \times 100$$

## 5.7 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los datos experimentales se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, realizando la comparación de medias por el método de Tukey con un nivel de significancia  $\alpha=0.05$ . Para llevar a cabo el análisis, se utilizó el paquete estadístico Minitab 18.

## 6. Resultados y discusiones

### 6.1 Cuenta viable

En la Tabla 5 se observan los resultados de la cuenta viable de las diferentes leches fermentadas durante los 21 días de muestreo. Los resultados obtenidos a lo largo del estudio demostraron que las leches fermentadas con cultivos probióticos no cumplieron con la concentración mínima recomendada de 9 log UFC/mL para estos productos. Sin embargo, la concentración aumentó hasta el final del almacenamiento, alcanzando concentraciones superiores a 7 log UFC/mL con excepción de la muestra LF5.

En el caso de esta leche fermentada, la cual es la única sin bacterias probióticas, la concentración fue variable, observando un incremento inusual al día 14 y un descenso de cinco unidades logarítmicas hacia el día 21. El comportamiento anterior, podría asociarse con el proceso de elaboración que tiene este tipo de producto, el cual sufre la fermentación dentro del envase para conseguir la coagulación de las proteínas lácteas y de esta forma, generar un gel, sin que la concentración de bacterias viables cobre relevancia. Adicionalmente, en muchos casos de producción de yogurt, se ha reportado que la concentración de microorganismos viables no alcanza una concentración superior a 4 log UFC/mL (Sarvari *et al.*, 2014).

En el mismo sentido, Mortazavian *et al.* (2007) determinaron que después de 15 días en refrigeración a diferentes temperaturas se alcanzaban las concentraciones más altas de bacterias ácido lácticas probióticas y que, a temperaturas inferiores a 7°C, la viabilidad era menor comparada con la refrigeración a 8°C.

**Tabla 5.** Concentración de bacterias ácido lácticas expresada en log UFC/mL de leches fermentadas comerciales durante almacenamiento refrigerado a 4°C durante 21 días.

Leche comercial	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21
LF1	3.50±0.00 <sup>b</sup>	7.95±0.07 <sup>a</sup>	8.04±0.06 <sup>a</sup>	7.90±0.08 <sup>a</sup>
LF2	3.50±0.00 <sup>b</sup>	7.70±0.00 <sup>a</sup>	7.87±0.12 <sup>a</sup>	7.69±0.12 <sup>a</sup>
LF3	6.77±0.10 <sup>b</sup>	8.05 ±0.21 <sup>a</sup>	8.04±0.27 <sup>a</sup>	8.04±0.27 <sup>a</sup>
LF4	3.50±0.00 <sup>b</sup>	8.02±0.09 <sup>a</sup>	8.59±0.10 <sup>a</sup>	8.35±0.44 <sup>a</sup>
LF5	3.50±0.00 <sup>b</sup>	3.50±0.00 <sup>b</sup>	7.63±0.21 <sup>a</sup>	2.50±0.00 <sup>c</sup>

Letras diferentes denotan diferencia significativa en la cuenta viable para cada leche fermentada durante los días de almacenamiento

A pesar de que se ha reportado que las bacterias del yogurt son más resistentes a las condiciones de refrigeración que los microorganismos probióticos (Mortazavian *et al.*, 2007), en el presente estudio no se observó esa relación. De hecho, fue la muestra LF5 que contenía este cultivo iniciador, la que tuvo el recuento más bajo al final del estudio.

Los resultados observados pueden ser explicados desde el enfoque de proto-cooperación entre las bacterias presentes en el yogurt, el cual es un mecanismo de sobrevivencia y al mismo tiempo de competencia entre las cepas presentes en el producto (Shah *et al.*, 1995). De esta forma, se ha demostrado que a mayor temperatura de almacenamiento (hasta 8°C) *L. delbruecki* ssp. crece más rápido, por lo tanto, las cantidades de ácido láctico producido y de peróxido de hidrógeno aumentan. Según Dave y Shah (1996), el peróxido de hidrógeno producido por *L. delbruecki* ssp. *bulgaricus* es el factor que incide mayormente en la viabilidad de microorganismo durante el almacenamiento refrigerado, lo que en este caso, coincide con los resultados obtenidos.

## 6.2 Análisis de pH y acidez titulable

En la Tabla 6 se presentan los datos obtenidos del análisis de pH y porcentaje de ácido láctico de las leches fermentadas comerciales durante el almacenamiento refrigerado. Los resultados muestran que las leches LF2 y LF5 no tuvieron variaciones significativas de pH desde el día 0 al 21; mientras que la acidez se mantuvo sin cambios durante los días de refrigeración para las muestras LF3, LF4 y LF5.

Para el caso de las leches que no mantuvieron un pH constante (LF1, LF3 y LF4), éstas exhibieron un comportamiento similar, donde las diferencias en este parámetro se presentaron en todos los casos a los días 7 y 14. Por otro lado, las muestras LF1 y LF2, las cuales mostraron algún cambio en la acidez a lo largo del estudio, lo presentaron también, entre los días 7 y 14, sugiriendo que estos son los días de almacenamiento con mayor influencia para los productos analizados.

**Tabla 6.** Comportamiento del pH y acidez (% ácido láctico) de leches fermentadas comerciales durante almacenamiento refrigerado a 4°C por 21 días.

Leche comercial	Día 0		Día 7		Día 14		Día 21	
	pH	Acidez	pH	Acidez	pH	Acidez	pH	Acidez
LF1	4.02±0.04 <sup>bc</sup>	5.00±0.06 <sup>A</sup>	4.23±0.04 <sup>a</sup>	5.27±0.19 <sup>A</sup>	3.99±0.01 <sup>c</sup>	1.89±0.13 <sup>B</sup>	4.13±0.04 <sup>ab</sup>	1.71±0.13 <sup>B</sup>
LF2	3.57±0.10 <sup>a</sup>	4.46±0.19 <sup>B</sup>	3.73±0.04 <sup>a</sup>	5.45±0.06 <sup>A</sup>	3.47±0.10 <sup>a</sup>	3.92±0.19 <sup>B</sup>	3.63±0.04 <sup>a</sup>	4.19±0.06 <sup>B</sup>
LF3	3.85±0.07 <sup>ab</sup>	3.47±0.19 <sup>A</sup>	4.05±0.07 <sup>a</sup>	3.51±0.13 <sup>A</sup>	3.75±0.07 <sup>b</sup>	3.02±0.06 <sup>A</sup>	3.95±0.07 <sup>ab</sup>	3.15±0.13 <sup>A</sup>
LF4	3.63±0.04 <sup>bc</sup>	3.20±0.06 <sup>A</sup>	3.79±0.01 <sup>a</sup>	3.47±0.06 <sup>A</sup>	3.53±0.04 <sup>c</sup>	3.06±0.25 <sup>A</sup>	3.69±0.01 <sup>ab</sup>	2.97±0.13 <sup>A</sup>
LF5	6.49±0.01 <sup>a</sup>	2.75±0.06 <sup>A</sup>	6.65±0.07 <sup>a</sup>	2.88±0.13 <sup>A</sup>	6.44±0.08 <sup>a</sup>	2.52±0.13 <sup>A</sup>	6.55±0.07 <sup>a</sup>	2.52±0.13 <sup>A</sup>

Letras minúsculas diferentes denotan diferencias significativas en el pH, mientras que letras mayúsculas diferentes denotan diferencias significativas para la acidez durante los días de almacenamiento

Los resultados obtenidos difieren de lo previamente reportado por Sarvari *et al.* (2014), quienes determinaron los cambios en pH, acidez y potencial redox de diferentes leches fermentadas mantenidas en refrigeración. Estos autores encontraron cambios significativos en el pH y acidez, con un constante descenso del pH y aumento en la concentración de ácido láctico después de 20 días de almacenamiento.

Sin embargo, en el presente estudio, pocos o nulos cambios en dichos parámetros fueron encontrados, lo cual podría ser asociado al pH inicial que presentaron las leches analizadas por Sarvari *et al.*, el cual era cercano a 5.5; mientras que las muestras analizadas en el presente estudio exhibieron, en su mayoría, un pH inicial de 4.5, correspondiente al punto isoeléctrico de las caseínas y al establecido de forma general para leches fermentadas comerciales.

De forma similar, Alazzeah *et al.* (2020) demostraron la influencia del pH inicial sobre los cambios posteriores en este parámetro durante el almacenamiento. Este grupo de investigación encontró un descenso en el pH desde 6 hasta 3.5 durante 28 días de refrigeración en leches fermentadas probióticas comerciales, lo cual generó además, problemas texturales en el producto final.

Por otro lado, se sabe que las leches fermentadas con pH's cercanos al punto isoeléctrico de las caseínas y que son almacenadas en refrigeración, presentan un descenso del pH mucho más lento, incluso, éste puede mantenerse constante hasta por 80 días de almacenamiento (Medina *et al.*, 1994). Así también, un estudio reciente demuestra que pH's cercanos a 4.5 podría considerarse como el límite del descenso, una vez que, en este punto, se ha logrado el equilibrio entre el pH y la acidez (Pato *et al.*, 2020). Lo anterior justifica los pocos cambios tanto en pH como en acidez encontrados en las cinco leches fermentadas comerciales analizadas.

### **6.3 Perfil proteolítico**

Con la finalidad de conocer la actividad hidrolítica de los cultivos iniciadores presentes en cada una de las leches fermentadas sobre el contenido proteico, se realizó un perfil proteolítico a través de dos técnicas: concentración de grupos amino libres por la técnica de TNBS y separación de péptidos por Tris-Glicina-SDS-PAGE.

#### **6.3.1 Determinación de grupos amino libres por TNBS**

Los cambios en la concentración de los grupos amino libres en las leches fermentadas comerciales fueron monitoreados durante los 21 días de almacenamiento en refrigeración. Se pudo observar que en general, la

concentración de aminos libres presentó pocos o nulos cambios significativos en la mayoría de las leches fermentadas comerciales (Tabla 7).

**Tabla 7.** Concentración de grupos amino libres (mg/L) de leches fermentadas comerciales durante almacenamiento refrigerado a 4°C por 21 días

Leche comercial	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21
	Concentración de grupos amino libres (mg/L)			
<b>LF1</b>	401.0±64.2 <sup>a</sup>	425.8±29.2 <sup>a</sup>	328.8±26.2 <sup>a</sup>	359.8±11.7 <sup>a</sup>
<b>LF2</b>	330.8±58.4 <sup>a</sup>	409.3 ±110.9 <sup>a</sup>	332.9±32.1 <sup>a</sup>	318.5±105.1 <sup>a</sup>
<b>LF3</b>	83.0±23.4 <sup>c</sup>	192.5 ±26.2 <sup>b</sup>	320.5±20.4 <sup>a</sup>	291.6±20.4 <sup>a</sup>
<b>LF4</b>	316.4±49.6 <sup>b</sup>	310.2±29.2 <sup>b</sup>	463.0±23.3 <sup>a</sup>	260.6±35.0 <sup>b</sup>
<b>LF5</b>	1869.4±137.3 <sup>a</sup>	1574.1±58.4 <sup>ab</sup>	1497.6±67.1 <sup>b</sup>	1553.5±17.5 <sup>ab</sup>

Letras diferentes denotan diferencia significativa en la concentración de aminos libres para cada leche fermentada durante los días de almacenamiento

Los cultivos iniciadores presentes en las leches que exhibieron una baja o nula tasa de hidrólisis durante el almacenamiento fueron las cepas de *L. casei* DN-114001, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus*, *L. casei* y *L. acidophilus*. De acuerdo con Donnkor *et al.* (2007) cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus* y *L. acidophilus* presentan una actividad proteolítica muy similar al fermentar leche por 24 h, teniendo en este tiempo su máxima actividad. Por otro lado, los mismos autores establecieron que existen diferencias en la capacidad proteolítica de cepas de *L. casei* donde algunas de éstas pueden tener una actividad metabólica sobre nitrógeno mucho más pronunciada con respecto al resto.

De forma más reciente Li *et al.*, (2019) demostraron que la actividad proteolítica de leches fermentadas almacenadas en refrigeración por 21 días es ascendente sólo en sistemas monocultivo inoculados con *S. thermophilus* y que al combinar a esta bacteria con algunas otras cepas de lactobacilos o bifidobacterias el incremento en la proteólisis es mínimo o termina siendo muy similar al propiciado por *S. thermophilus* de forma individual. Lo anterior justifica ampliamente los resultados obtenidos, ya que la mayoría de las leches fermentadas analizadas estaban inoculadas con más de una bacteria en la mayoría de todos los casos.

Una de las muestras que exhibió un número mayor de cambios en los amino libres durante el almacenamiento fue la leche LF3, la cual tuvo un ascenso gradual en la concentración desde el inicio ( $83.0 \pm 23.36$  mg/L) hasta el día 14 ( $320.5 \pm 20.4$  mg/L), misma que se mantuvo constante hasta el final del almacenamiento.

El probiótico presente en la muestra LF3 es la cepa *L. casei* spp., la cual ha sido reportada en diferentes estudios, como los llevados a cabo por Nighswonger *et al.* (1996) y más recientemente por Sumalapao *et al.* (2017). Ambos grupos de investigación evaluaron la sobrevivencia y actividad metabólica de diferentes cepas de *L. casei* en leches fermentadas comerciales, encontrando que, a pesar de la nula diferencia en la concentración de microorganismos durante el almacenamiento refrigerado, existió una actividad metabólica relacionada con la hidrólisis de proteínas.

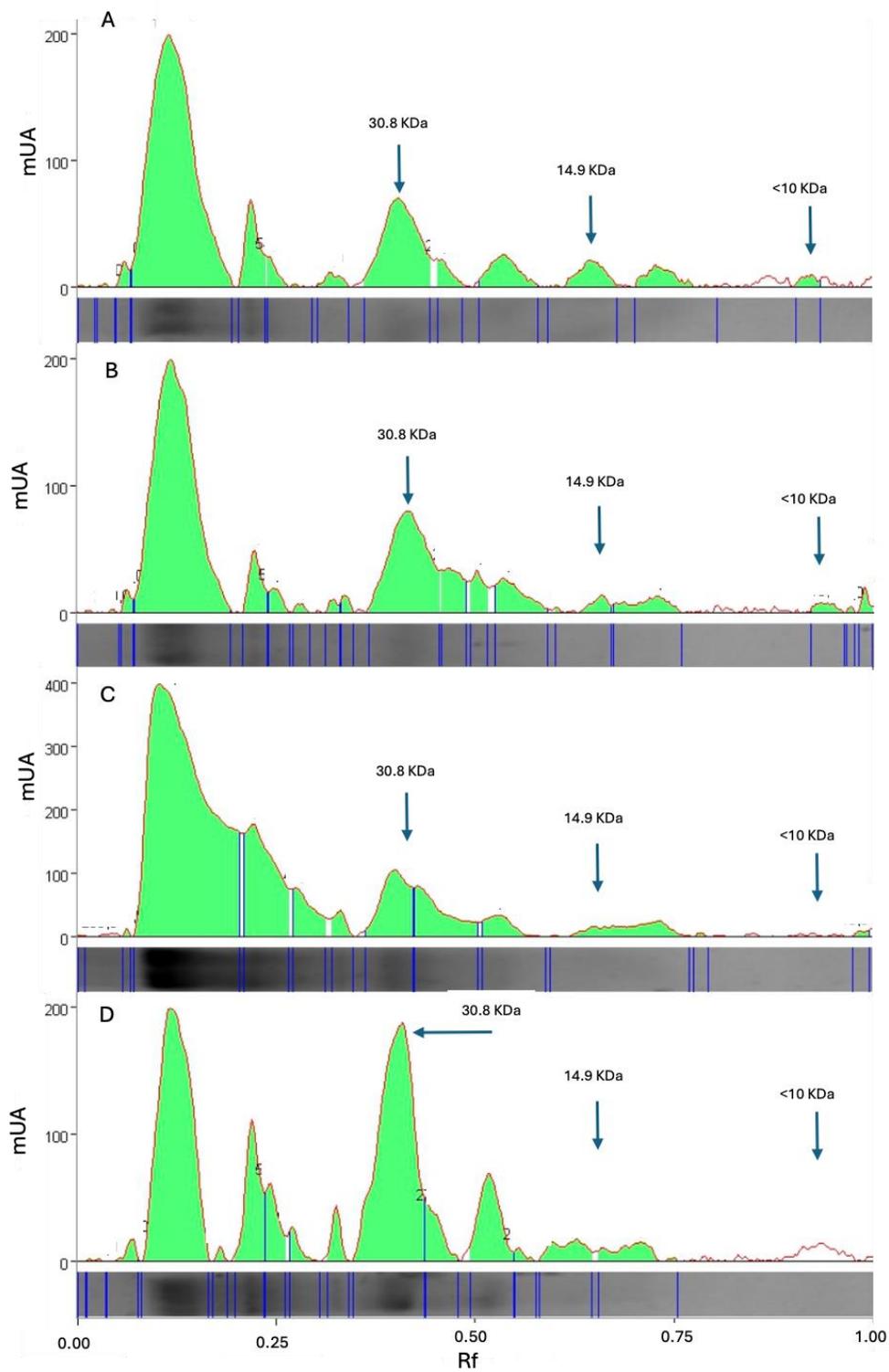
Adicionalmente, se sabe que la concentración de grupos amino libres puede ser variable de acuerdo al metabolismo de cada bacteria ácido láctica durante el proceso de fermentación y almacenamiento (Olvera-Rosales *et al.*, 2023). En este sentido, González-Olivares *et al.* (2011) encontraron un patrón similar al de la muestra LF3 para la producción de péptidos durante el almacenamiento refrigerado de leches fermentadas comerciales, donde la producción de péptidos alcanzaba un máximo en los primeros días de almacenamiento y después se presentaba un descenso a los 15 días de refrigeración.

El comportamiento anterior también se ha observado en otras matrices lácteas, en las que se presenta un descenso en la concentración de grupos amino libres en los primeros días de almacenamiento para continuar con un ascenso. Posteriormente, este ascenso puede presentar un nuevo descenso o mantener una concentración constante (Contreras-López *et al.*, 2023; Ramírez-Godínez *et al.*, 2021), debido, principalmente, a las necesidades de nitrógeno y a las auxotrofías independientes de cada microorganismo (Olvera-Rosales *et al.*, 2023).

### 6.3.2 Separación de fracciones peptídicas por Tris-Glicina-SDS-PAGE

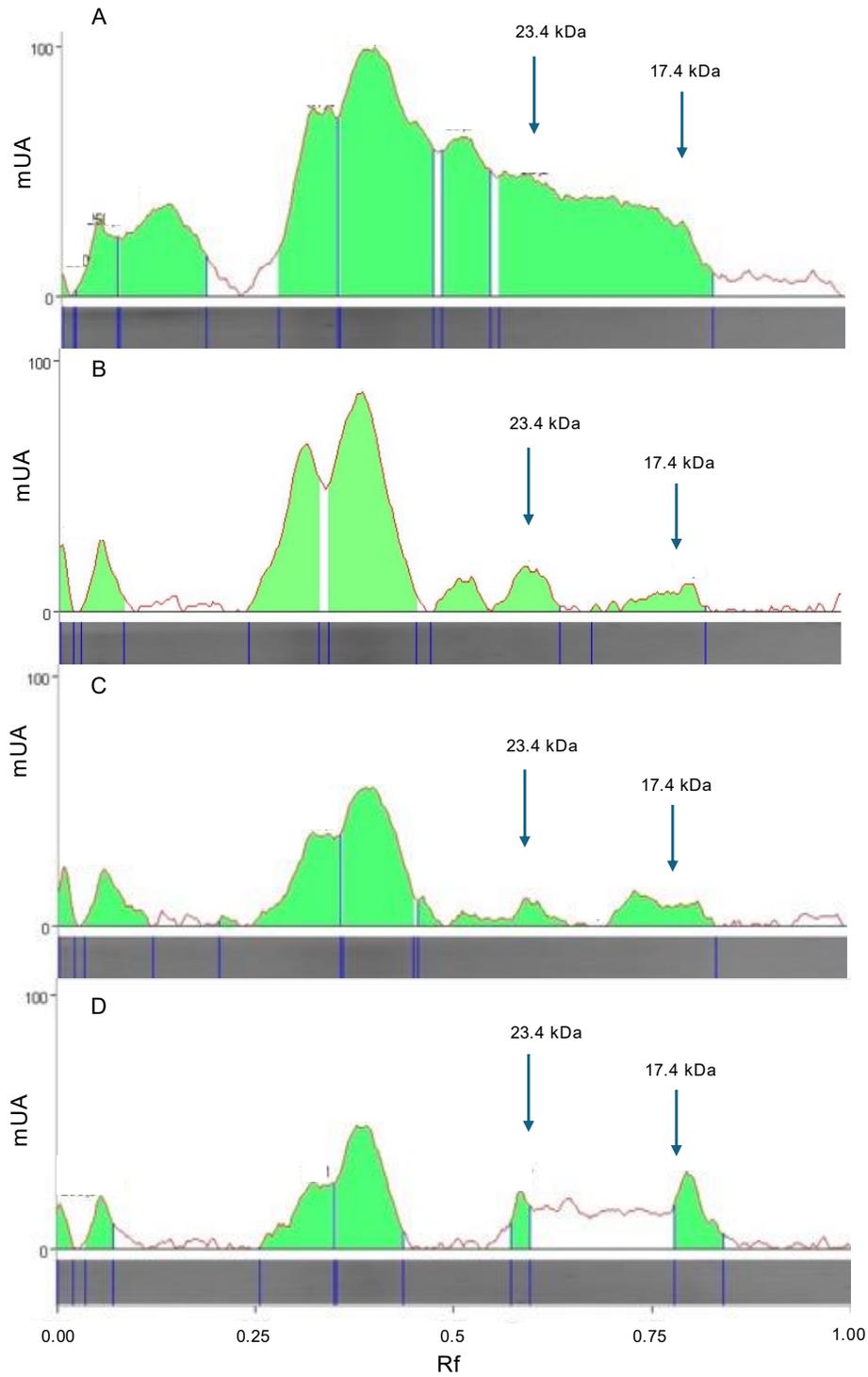
En las figuras 2 a la 6 se muestran los electroferogramas de las leches fermentadas comerciales evaluadas. Estos electroferogramas fueron obtenidos después de analizar los geles de separación a través del software GelDoc de Bio-Rad. Como es posible observar, las leches LF1, LF3, LF4 y LF5 presentaron péptidos inferiores a 10 kDa, mientras que en la leche LF2, la presencia de péptidos de bajo peso molecular fue nula o al menos indetectable a través del método utilizado. No obstante, en todas las muestras se pudo observar un patrón de degradación de proteínas de alto peso molecular, destacando la hidrólisis de proteínas con pesos moleculares de entre 27 a 35 kDa, los cuales son asociados a las caseínas presentes en cada leche fermentada. Además, es evidente el descenso en la concentración de proteínas de suero como  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina con pesos moleculares de 14.4 y 18 kDa respectivamente.

Algunos estudios han encontrado que cepas de lactobacilos en condiciones de refrigeración exhiben una actividad proteolítica sobre las caseínas  $\alpha_{s1}$  y  $\beta$ , principalmente, pero también, muestran una preferencia sobre la degradación de  $\beta$ -lactoglobulina comparada con otras proteínas séricas (González-Olivares *et al.*, 2011; Satılmış *et al.*, 2023). Lo anterior demuestra que la hidrólisis encontrada en las leches fermentadas analizadas es comparable con reportes previos de estudios similares.



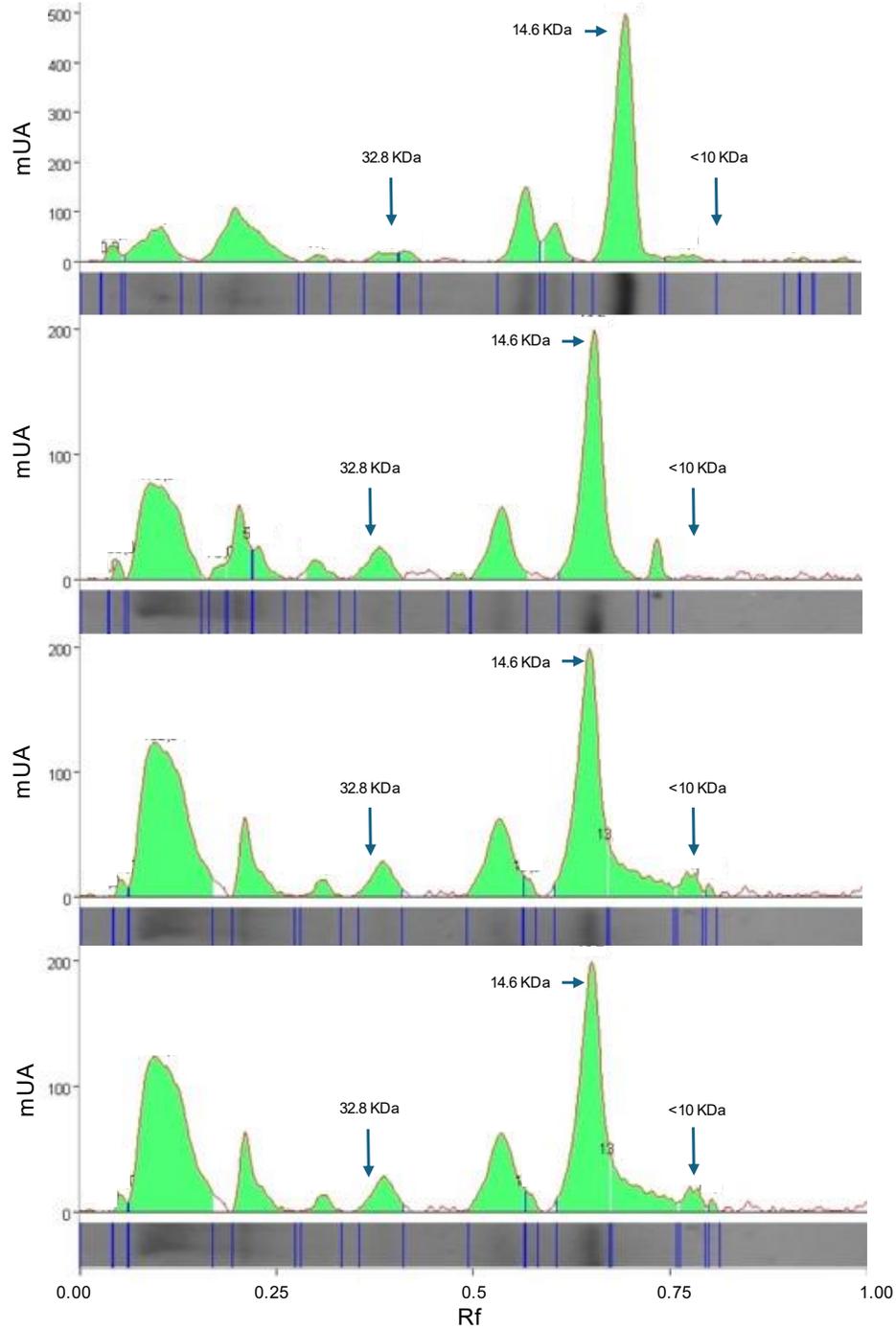
**Figura 2.** Electroferograma de la separación de péptidos de leche fermentada LF1.

A: día 0; B: día 7; C: día 14; D: día 21.

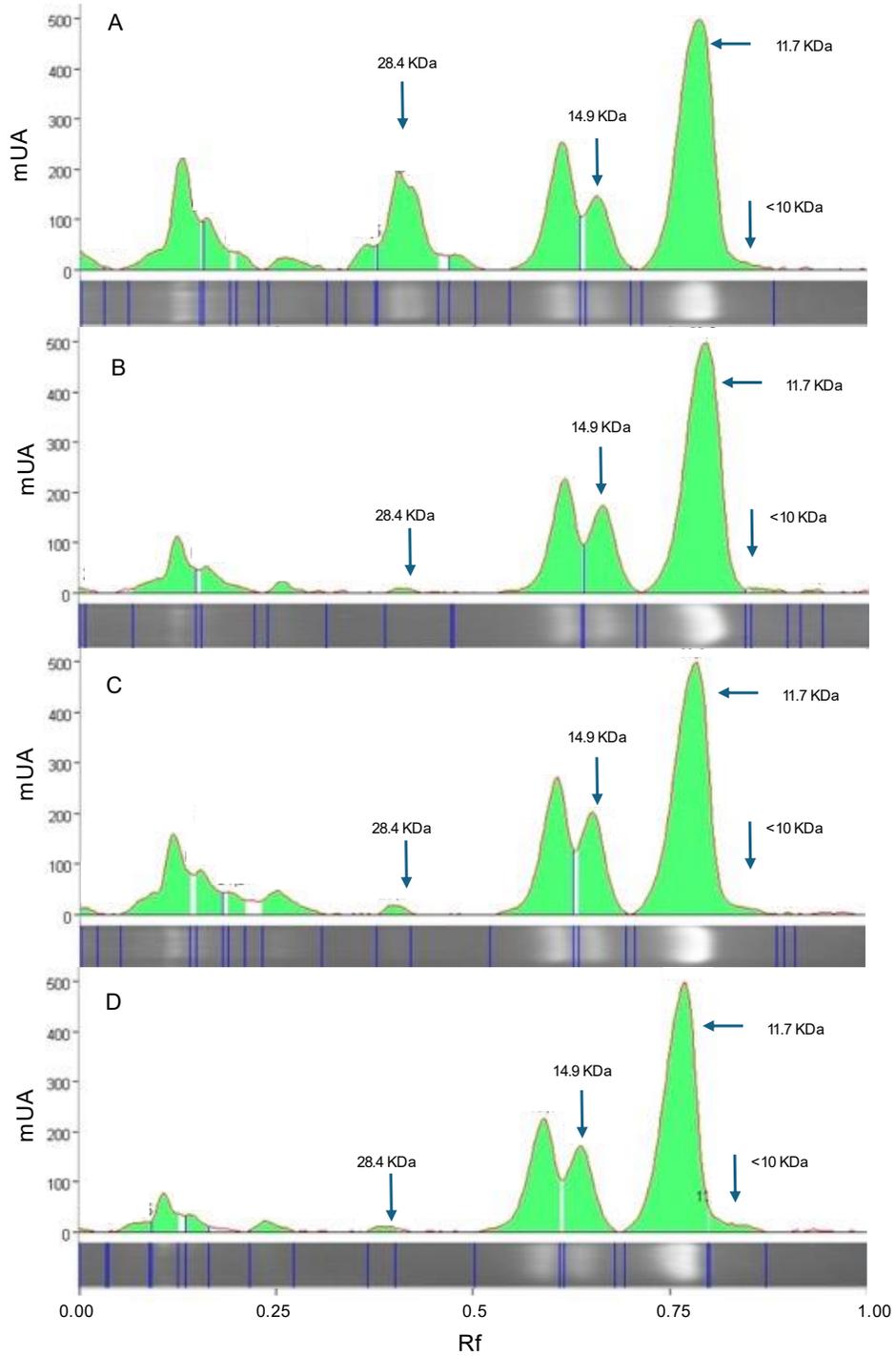


**Figura 3.** Electroferograma de la separación de péptidos de leche fermentada LF2.

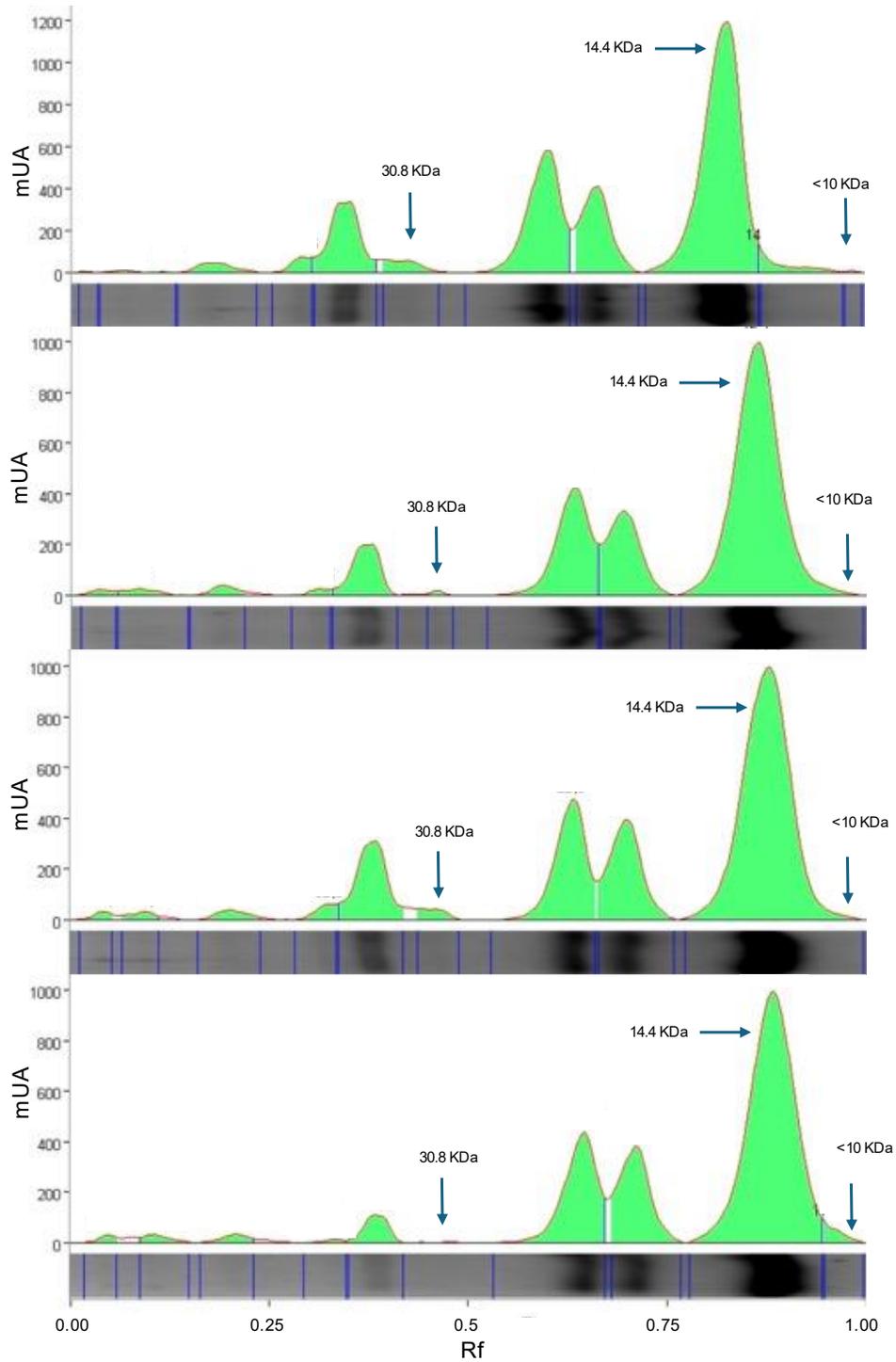
A: día 0; B: día 7; C: día 14; D: día 21.



**Figura 4.** Electroferograma de la separación de péptidos de leche fermentada LF3.  
A: día 0; B: día 7; C: día 14; D: día 21.



**Figura 5.** Electroferograma de la separación de péptidos de leche fermentada LF4.  
 A: día 0; B: día 7; C: día 14; D: día 21.



**Figura 6.** Electroferograma de la separación de péptidos de leche fermentada LF5.

A: día 0; B: día 7; C: día 14; D: día 21.

En el caso específico de la leche LF2, la nula detección de péptidos de bajo peso molecular podría estar asociada a la baja concentración de leche que tiene el producto. Esta bebida láctea fermentada probiótica se encuentra elaborada con *L. paracasei* subsp. *paracasei* Shirota en una matriz de 2% de leche descremada en polvo. A pesar de la capacidad proteolítica probada de este lactobacilo en refrigeración (Kitaevskaya *et al.*, 2022), no se encontraron péptidos de menos de 10 kDa (Figura 2). Previamente, González-Olivares *et al.* (2011) pudieron observar la presencia de este tipo de péptidos en la misma leche fermentada, pero a través de una separación electroforética específica para péptidos de bajo peso molecular, lo cual indica que mediante una técnica de mayor especificidad podrían detectarse este tipo de fracciones proteicas.

Adicionalmente, se sabe que el sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas es activado de forma específica de acuerdo a las necesidades nutricionales de nitrógeno, por lo que cada tipo de péptido liberado es dependiente de una activación particular (Olvera-Rosales *et al.*, 2023). Por lo anterior, una combinación de microorganismos en un mismo producto cobra gran relevancia, ya que puede lograr la liberación tanto de péptidos de menor peso molecular como de diferentes tipos de secuencias, debido a la proto-cooperación que existe entre las cepas presentes (Novak *et al.*, 2021).

Este caso particular se observó en las muestras LF1 y LF5, las cuales cuentan con dos a tres diferentes tipos de bacterias ácido lácticas en su composición. De esta forma, la implementación de consorcios de bacterias ácido lácticas afecta el contenido de los bio-péptidos, favoreciendo la liberación de fracciones derivados de la  $\beta$ -caseína a través de la actividad proteolítica de cada uno de los cultivos iniciadores inoculados.

Así también, los requerimientos específicos de nitrógeno de cada una de las cepas presentes en el consorcio, genera un valor agregado al producto fermentado final, ya que además de la funcionalidades probióticas o tecnológicas exhibidas por estas bacterias, su metabolismo aporta fracciones proteicas con actividad biológica

mediante la liberación de secuencias encriptadas tanto en las caseínas como las proteínas séricas (Kieliszek *et al.*, 2021; Novak *et al.*, 2021).

## 6.4 Determinación de la capacidad antihipertensiva: inhibición de la ECA

Después de analizar la capacidad antihipertensiva de las fracciones peptídicas de las leches fermentadas a los días 0 y 21 de almacenamiento (Tabla 8), no se encontraron diferencias significativas en todos los casos, lo que indica que esta actividad biológica se mantiene sin cambios durante el almacenamiento refrigerado.

Además, todas las leches fermentadas presentaron un porcentaje de inhibición de ECA por encima del 80%, resultados superiores a los observados en otras leches fermentadas probióticas reportadas por Sebastián-Nicolás *et al.* (2021) y Solanki *et al.* (2022) pero que no eran de origen comercial ni fueron mantenidas en refrigeración, por lo que el presente estudio cobra gran relevancia al ser el primero en llevar a cabo este análisis.

**Tabla 8.** Actividad antihipertensiva de leches fermentadas comerciales medida por el porcentaje de inhibición de enzima convertidora de angiotensina (ECA) al inicio y al final de almacenamiento refrigerado

Leche comercial	Inhibición de ECA (%)	
	Día 0	Día 21
LF1	84.8±6.0 <sup>a</sup>	84.1±0.7 <sup>a</sup>
LF2	87.6±4.7 <sup>a</sup>	85.9±3.6 <sup>a</sup>
LF3	84.9±5.8 <sup>a</sup>	83.8±3.8 <sup>a</sup>
LF4	88.7±1.8 <sup>a</sup>	87.0±3.8 <sup>a</sup>
LF5	80.7±0.2 <sup>a</sup>	84.1±2.5 <sup>a</sup>

Letras diferentes denotan diferencia significativa en la capacidad antihipertensiva para cada leche fermentada a los días 0 y 21 de almacenamiento

Por otro lado, tampoco se encontraron diferencias significativas en la inhibición de la ECA entre las leches fermentadas analizadas, ni al día 0 ni al 21, indicando que, cualquier leche fermentada comercial evaluada, podría ser consumida y generaría un efecto biológico similar.

La capacidad antihipertensiva determinada se encuentra directamente asociada con los resultados previamente obtenidos en los análisis de TNBS y Tris-Glicina-SDS-PAGE, donde se dio cuenta que existían patrones de degradación tanto de proteínas séricas como de caseínas, originando péptidos de peso molecular menor a 10 kDa, los cuales han sido relacionados con propiedades bioactivas diversas, entre ellas las de la inhibición de ECA.

Así mismo, se demostró que, para estos productos comerciales, la concentración de grupos aminos libres no mantuvo un efecto importante sobre la bioactividad, pues a pesar de que en la muestra LF5 existió una mayor concentración (1553-1869 mg/L), la actividad antihipertensiva fue equivalente a la mostrada por las demás leches fermentadas, las cuales tenían en promedio entre 300 y 400 mg/L de aminos libres.

De acuerdo a Begunova *et al.* (2020), la capacidad proteolítica puede ser altamente variable por la presencia de diferentes bacterias ácido lácticas y, además, puede verse disminuida por la refrigeración. Esto último, podría afectar la actividad antihipertensiva, según lo reportado por Pihlanto *et al.* (2010), ya que un mayor grado de hidrólisis ha sido relacionado con una mayor probabilidad de encontrar péptidos antihipertensivos. No obstante, los pocos o nulos cambios encontrados en la concentración de grupos amino libres en todas las leches fermentadas, seguramente favorecieron el mantenimiento de la actividad biológica a lo largo del almacenamiento.

Otros estudios que confirman la asociación entre la baja tasa metabólica sobre nitrógeno aquí encontrada y el mantenimiento en la actividad inhibitoria de ECA son aquellos reportados por Nielsen *et al.* (2009) y Şanlı *et al.* (2018). El primer grupo de investigación determinó que la actividad antihipertensiva podía ser perdida a los 7 días de almacenamiento refrigerado, especialmente en leches fermentadas por *L. helveticus*, *L. acidophilus* y *S. thermophilus*; mientras que los otros investigadores encontraron una pérdida de casi el 50% en esta bioactividad después de 28 días de almacenamiento. En el mismo sentido, Meira *et al.*, (2012) y Habibi *et al.*, (2019), hallaron una relación directa entre una proteólisis excesiva y una disminución de la

actividad inhibitoria sobre ECA, lo que justifica ampliamente los resultados obtenidos.

De hecho, los péptidos con capacidad antihipertensiva pueden descomponerse en aminoácidos o péptidos más pequeños debido a la diversa especificidad mostrada por las peptidasas bacterianas. Lo anterior, como consecuencia, repercute negativamente en el potencial antihipertensivo (Olvera-Rosales *et al.*, 2023). Es así que los resultados obtenidos en el presente estudio proporcionan información valiosa acerca del periodo de consumo de cada una de las leches fermentadas, determinando que la actividad antihipertensiva no se ve disminuida durante el almacenamiento refrigerado, al menos dentro de los 28 días previos a la fecha de caducidad impuesta por el fabricante.

## 7. Conclusiones

Los productos analizados presentaron en general, una concentración menor a la recomendada para que las bacterias probióticas ejerzan un beneficio a la salud. Adicionalmente, se observó una baja actividad metabólica durante el almacenamiento refrigerado tanto a nivel de metabolismo de fuentes de carbono como de nitrógeno. No obstante, en todas las leches fermentadas analizadas se encontró un patrón de degradación de caseínas y proteínas séricas, identificando fracciones peptídicas menores a 10 kDa.

Además, la actividad antihipertensiva no se vio disminuida o eliminada durante el tiempo de almacenamiento bajo condiciones de refrigeración, por lo que los productos analizados pueden ser consumidos en cualquier punto previo a la fecha de caducidad declarada y podrán otorgar un beneficio biológico similar.

Finalmente, aunque los resultados *in vitro* son bastante alentadores, se deben analizar de forma *in vivo* las propiedades beneficiosas comprobadas para poder catalogar a los productos evaluados como leches fermentadas funcionales.

## 8. Referencias bibliográficas

- Abdel-Hamid, M., Romeih, E., Gamba, R. R., Nagai, E., Suzuki, T., Koyanagi, T., & Enomoto, T. (2019). The biological activity of fermented milk produced by *Lactobacillus casei* ATCC 393 during cold storage. *International Dairy Journal*, *91*, 1-8.
- Aguilar-Toalá, J. E., Santiago-López, L., Peres, C. M., Peres, C., Garcia, H. S., Vallejo-Cordoba, B., ... & Hernández-Mendoza, A. (2017). Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of dairy science*, *100*(1), 65-75.
- Akbarian, M., Khani, A., Eghbalpour, S., & Uversky, V. N. (2022). Bioactive peptides: Synthesis, sources, applications, and proposed mechanisms of action. *International journal of molecular sciences*, *23*(3), 1445.
- Alazzeh, A. Y., Zrieq, R., Azzeh, F. S., Smadi, M. M., Sulaiman, S., & Qiblawi, S. (2020). Initial enumeration and viability of probiotic strains in commercial yogurt products under refrigerated conditions. *International Journal of Advanced and Applied Sciences*, *7*, 11-16.
- Ali, M. A., Kamal, M. M., Rahman, M. H., Siddiqui, M. N., Haque, M. A., Saha, K. K., & Rahman, M. A. (2022). Functional dairy products as a source of bioactive peptides and probiotics: Current trends and future perspectives. *Journal of Food Science and Technology*, *59*(4), 1263-1279.
- Aluko, R. E. (2015). Antihypertensive peptides from food proteins. *Annual review of food science and technology*, *6*, 235-262.
- Amorim, F. G., Coitinho, L. B., Dias, A. T., Friques, A. G. F., Monteiro, B. L., de Rezende, L. C. D., ... & Quinton, L. (2019). Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteopeptidomics: Bioprospection of antihypertensive molecules. *Food chemistry*, *282*, 109-119.
- Aslam, M. Z., Aslam, M. S., Firdos, S., Ghous, G., Firdos, G., Hongfei, Z., & Bolin, Z. (2019). Role of bioactive peptides in reducing the severity of hypertension with the inhibition of ACE. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *25*, 1639-1649.
- Ayala-Niño, A., Rodríguez-Serrano, G. M., González-Olivares, L. G., Contreras-López, E., Regal-López, P., & Cepeda-Saez, A. (2019). Sequence identification of bioactive peptides from amaranth seed proteins (*Amaranthus hypochondriacus* spp.). *Molecules*, *24*(17), 3033.
- Ayivi, R. D., & Ibrahim, S. A. (2022). Lactic acid bacteria: an essential probiotic and starter culture for the production of yoghurt. *International Journal of Food Science & Technology*, *57*(11), 7008-7025.
- Ayivi, R. D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, S. O., Worku, M., Tahergorabi, R., ... & Ibrahim, S. A. (2020). Lactic acid bacteria:

Food safety and human health applications. *Dairy*, 1(3), 202-232.

Begunova, A. V., Savinova, O. S., Glazunova, O. A., Moiseenko, K. V., Rozhkova, I. V., & Fedorova, T. V. (2020). Development of antioxidant and antihypertensive properties during growth of *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus reuteri* on cow's milk: Fermentation and peptidomics study. *Foods*, 10(1), 17.

Beltrán-Barrientos, L. M., Hernández-Mendoza, A., Torres-Llanaez, M. J., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Córdova, B. (2016). Invited review: Fermented milk as antihypertensive functional food. *Journal of dairy science*, 99(6), 4099-4110.

Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS microbiology*, 4(4), 665.

Boutron, M. C., Faivre, J., Marteau, P., Couillault, C., Senesse, P., & Quipourt, V. (1996). Calcium, phosphorus, vitamin D, dairy products and colorectal carcinogenesis: a French case-control study. *British Journal of Cancer*, 74(1), 145-151.

Brown, L., Pingitore, E. V., Mozzi, F., Saavedra, L., M Villegas, J., & M Hebert, E. (2017). Lactic acid bacteria as cell factories for the generation of bioactive peptides. *Protein and peptide letters*, 24(2), 146-155.

Cakir, B., & Tunali-Akbay, T. (2021). Potential anticarcinogenic effect of goat milk-derived bioactive peptides on HCT-116 human

colorectal carcinoma cell line. *Analytical biochemistry*, 622, 114166.

Chai, K. F., Voo, A. Y. H., & Chen, W. N. (2020). Bioactive peptides from food fermentation: A comprehensive review of their sources, bioactivities, applications, and future development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 3825-3885.

Chen, L., Wang, L., Li, J., & Shu, G. (2021). Antihypertensive potential of fermented milk: The contribution of lactic acid bacteria proteolysis system and the resultant angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide. *Food & Function*, 12(22), 11121-11131.

Chugh, B., & Kamal-Eldin, A. (2020). Bioactive compounds produced by probiotics in food products. *Current Opinion in Food Science*, 32, 76-82.

Clare, D. A., & Swaisgood, H. E. (2000). Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of dairy science*, 83(6), 1187-1195.

Contreras-López, E., Félix-Reyes, N. L., González-Olivares, L. G., Jaimez-Ordaz, J., Castañeda-Ovando, A., Añorve-Morga, J., ... & Ramírez-Godínez, J. (2023). Aguamiel Enhance Proteolytic Activity and Survival of *Lactiplantibacillus pentosus* ABHEAU-05 during Refrigerated Storage of a Fermented Milk. *Fermentation*, 9(9), 841.

Cucick, A. C. C., Gianni, K., Todorov, S. D., de LeBlanc, A. D. M., LeBlanc, J., & Franco, B. D.

(2020). Evaluation of the bioavailability and intestinal effects of milk fermented by folate producing lactic acid bacteria in a depletion/repletion mice model. *Journal of Functional Foods*, 66, 103785. del Mar Contreras, M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M., & Recio, I. (2009). Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International dairy journal*, 19(10), 566-573.

Cushman, D. W., Wang, F. L., Fung, W. C., Grover, G. J., Harvey, C. M., Scalese, R. J., ... & DeForrest, J. M. (1989). Comparisons in vitro, ex vivo, and in vivo of the actions of seven structurally diverse inhibitors of angiotensin converting enzyme (ACE). *British journal of clinical pharmacology*, 28(S2), 115S-131S.

Das, S., & Hati, S. (2022). Food derived ACE inhibitory peptides: science to application. In *Nutrition and Functional Foods in Boosting Digestion, Metabolism and Immune Health* (pp. 39-54). Academic Press.

Dave, R. I., & Shah, N. P. (1997). Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, 7(1), 31-41.

de Lima, M. D. S. F., da Silva, R. A., da Silva, M. F., da Silva, P. A. B., Costa, R. M. P. B., Teixeira, J. A. C., ... & Cavalcanti, M. T. H. (2018). Brazilian kefir-fermented sheep's milk, a source of antimicrobial and antioxidant

peptides. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10, 446-455.

Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2007). Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Le Lait*, 87(1), 21-38.

Duque-Buitrago, L. F., Tornero-Martínez, A., Loera-Castañeda, V., & Mora-Escobedo, R. (2023). Use of food and food-derived products in the treatment of gastritis: a systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(22), 5771-5782.

Escamilla Rosales, M. F., Olvera Rosales, L., Jara Gutiérrez, C. E., Jaimez Ordaz, J., Santana Sepúlveda, P. A., & González Olivares, L. G. (2023). Proteins of milk, egg and fish as a source of antioxidant peptides: production, mechanism of action and health benefits. *Food Reviews International*, 1-21.

Fernández-Musoles, R., Salom, J. B., Martínez-Maqueda, D., López-Díez, J. J., Recio, I., & Manzanares, P. (2013). Antihypertensive effects of lactoferrin hydrolyzates: Inhibition of angiotensin-and endothelin-converting enzymes. *Food chemistry*, 139(1-4), 994-1000.

Ferrario, C. M., Jessup, J., Gallagher, P. E., Averill, D. B., Brosnihan, K. B., Tallant, E. A., ... & Chappell, M. C. (2005). Effects of renin-angiotensin system blockade on renal angiotensin-(1-7) forming enzymes and

receptors. *Kidney international*, 68(5), 2189-2196.

Figuerola-González, I., Hernández-Sánchez, H., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M., & Cruz-Guerrero, A. (2010). Antimicrobial effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota co-cultivated with *Escherichia coli* UAM0403. *Revista mexicana de ingeniería química*, 9(1), 11-16.

FitzGerald, R. J., & Meisel, H. (2000). Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *British journal of nutrition*, 84(S1), 33-37.

Galdeano, C. M., de LeBlanc, A. D. M., Carmuega, E., Weill, R., & Perdigón, G. (2009). Mechanisms involved in the immunostimulation by probiotic fermented milk. *Journal of Dairy Research*, 76(4), 446-454.

Garibay, M. G., Ramírez, R. Q., & Canales, A. L. M. (Eds.). (1993). *Biotechnología alimentaria*. Editorial Limusa.

Glazunova, O. A., Moiseenko, K. V., Savinova, O. S., & Fedorova, T. V. (2022). In vitro and in vivo antihypertensive effect of milk fermented with different strains of common starter Lactic Acid Bacteria. *Nutrients*, 14(24), 5357.

González-Olivares, L. G., Añorve-Morga, J., Castañeda-Ovando, A., Contreras-López, E., & Jaimez-Ordaz, J. (2014). Peptide separation of commercial fermented milk during refrigerated storage. *Food Science and Technology*, 34, 674-679.

González-Olivares, L. G., Jiménez-Guzmán, J., Cruz-Guerrero, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., & García-Garibay, M. (2011). Liberación de péptidos bioactivos por bacterias lácticas en leches fermentadas comerciales. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(2), 179-188.

Guha, S., Sharma, H., Deshwal, G. K., & Rao, P. S. (2021). A comprehensive review on bioactive peptides derived from milk and milk products of minor dairy species. *Food production, processing and nutrition*, 3(1), 1-21.

Habibi Najafi, M. B., Fatemizadeh, S. S., & Tavakoli, M. (2019). Release of proteolysis products with ACE-inhibitory and antioxidant activities in probiotic yogurt containing different levels of fat and prebiotics. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 25, 367-377.

Hadjimbei, E., Botsaris, G., & Chrysostomou, S. (2022). Beneficial effects of yoghurts and probiotic fermented milks and their functional food potential. *Foods*, 11(17), 2691.

Harrison, D. G., Coffman, T. M., & Wilcox, C. S. (2021). Pathophysiology of hypertension: the mosaic theory and beyond. *Circulation research*, 128(7), 847-863.

Hernández-Ledesma, B., del Mar Contreras, M., & Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in colloid and interface science*, 165(1), 23-35.

- Ibrahim, S. A., Gyawali, R., Awaisheh, S. S., Ayivi, R. D., Silva, R. C., Subedi, K., ... & Krastanov, A. (2021). Fermented foods and probiotics: An approach to lactose intolerance. *Journal of Dairy Research*, 88(3), 357-365.
- Ishida, Y., Nakamura, F., Kanzato, H., Sawada, D., Yamamoto, N., Kagata, H., ... & Fujiwara, S. (2005). Effect of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 on symptoms of Japanese cedar pollen allergy: a randomized placebo-controlled trial. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69(9), 1652-1660.
- Jäkälä, P., & Vapaatalo, H. (2010). Antihypertensive peptides from milk proteins. *Pharmaceuticals*, 3(1), 251-272.
- Juillard, V., Le Bars, D., Kunji, E. R., Konings, W. N., Gripon, J. C., & 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.
- Juille, O., Bars, D. L., & Juillard, V. (2005). The specificity of oligopeptide transport by *Streptococcus thermophilus* resembles that of *Lactococcus lactis* and not that of pathogenic streptococci. *Microbiology*, 151(6), 1987-1994.
- Karami, Z., & Akbari-Adergani, B. (2019). Bioactive food derived peptides: A review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *Journal of food science and technology*, 56, 535-547.
- Kaur, H., Kaur, G., & Ali, S. A. (2022). Dairy-based probiotic-fermented functional foods: An update on their health-promoting properties. *Fermentation*, 8(9), 425.
- Khorshidian, N., Yousefi, M., & Mortazavian, A. M. (2020). Fermented milk: The most popular probiotic food carrier. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 94, pp. 91-114). Academic Press.
- Kieliszek, M., Pobiega, K., Piwowarek, K., & Kot, A. M. (2021). Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria. *Molecules*, 26(7), 1858.
- Kitaevskaya, S. V., Ponomarev, V. Y., & Reshetnik, O. A. (2022). Evaluation of the proteolytic activity of new cryoresistant *Lactobacillus* strains. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*, 12(1), 76-86.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International dairy journal*, 16(9), 945-960.
- Kunji, E. R., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., & Konings, W. N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 187-221.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.

Lanzer, D., Santos, R. A. S., Etelvino, G. M., Xavier, C. H., de Almeida Santos, J., Mendes, E. P., ... & de Camargo, A. C. M. (2007). Do the cardiovascular effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) I involve ACE-independent mechanisms? New insights from proline-rich peptides of *Bothrops jararaca*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322(2), 795-805.

Law, J., & Haandrikman, A. (1997). Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 7(1), 1-11.

LeBlanc, J. G., Matar, C., Valdez, J. C., LeBlanc, J., & Perdigon, G. (2002). Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science*, 85(11), 2733-2742.

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

Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.

Li, S., Tang, S., He, Q., Hu, J., & Zheng, J. (2019). Changes in proteolysis in fermented milk produced by *Streptococcus thermophilus*

in co-culture with *Lactobacillus plantarum* or *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* during refrigerated storage. *Molecules*, 24(20), 3699.

Liao, W., Fan, H., Davidge, S. T., & Wu, J. (2019). Egg white-derived antihypertensive peptide IRW (Ile-Arg-Trp) reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats via the ACE2/ang (1-7)/mas receptor Axis. *Molecular nutrition & food research*, 63(9), 1900063.

Linares, D. M., Gómez, C., Renes, E., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E., Ross, R. P., & Stanton, C. (2017). Lactic acid bacteria and bifidobacteria with potential to design natural biofunctional health-promoting dairy foods. *Frontiers in microbiology*, 8, 846.

Lönnerdal, B. (2004). Human milk proteins: key components for the biological activity of human milk. *Protecting infants through human milk: Advancing the scientific evidence*, 11-25.

Marshall, V. M., & Tamime, A. Y. (1997). Starter cultures employed in the manufacture of biofermented milks. *International Journal of Dairy Technology*, 50(1), 35-41.

Martínez Mazzei, A. B. (2022). Hidrolizados enzimáticos de espirulina con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina-I.

Matar, C., Goulet, J., Bernier, R. L., & Brochu, E. (2000). Bioactive peptides from fermented foods: their role in the immune system. In *Probiotics 3: Immunomodulation by the gut*

*microflora and probiotics* (pp. 193-212). Dordrecht: Springer Netherlands.

Medina, L. M., & Jordano, R. (1994). Survival of constitutive microflora in commercially fermented milk containing bifidobacteria during refrigerated storage. *Journal of Food Protection*, 57(8), 731-733.

Meira, S. M. M., Daroit, D. J., Helfer, V. E., Corrêa, A. P. F., Segalin, J., Carro, S., & Brandelli, A. (2012). Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Research International*, 48(1), 322-329.

Meisel, H. (2004). Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors*, 21(1-4), 55-61.

Meisel, H., & Bockelmann, W. (1999). Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76, 207-215.

Melini, F., Melini, V., Luziatelli, F., Ficca, A. G., & Ruzzi, M. (2019). Health-promoting components in fermented foods: an up-to-date systematic review. *Nutrients*, 11(5), 1189.

Méndez Utz, V. E., Pérez Visñuk, D., Perdigón, G., & de Moreno de LeBlanc, A. (2021). Milk fermented by *Lactobacillus casei* CRL431 administered as an immune adjuvant in models of breast cancer and metastasis under chemotherapy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 327-340.

Mierau, I., Kunji, E. R., Venema, G., & Kok, J. (1997). Casein and peptide degradation in lactic acid bacteria. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 14(1), 279-302.

Miles, A. A., Misra, S. S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology & Infection*, 38(6), 732-749.

Moreno-Montoro, M., Olalla-Herrera, M., Rufián-Henares, J. Á., Martínez, R. G., Miralles, B., Bergillos, T., ... & Jauregi, P. (2017). Antioxidant, ACE-inhibitory and antimicrobial activity of fermented goat milk: activity and physicochemical property relationship of the peptide components. *Food & function*, 8(8), 2783-2791.

Mortazavian, A. M., Ehsani, M. R., Mousavi, S. M., Rezaei, K., Sohrabvandi, S., & Reinheimer, J. A. (2007). Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic micro-organisms in yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, 60(2), 123-127.

Nardo, A. E., Suárez, S., Quiroga, A. V., & Añón, M. C. (2020). Amaranth as a source of antihypertensive peptides. *Frontiers in Plant Science*, 11, 578631.

Nielsen, M. S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K. I., & Otte, J. (2009). Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and

storage time. *International Dairy Journal*, 19(3), 155-165.

Nighswonger, B. D., Brashears, M. M., & Gilliland, S. E. (1996). Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. *Journal of dairy science*, 79(2), 212-219.

Noe, C. R., & Noe-Letschnig, M. (2021). The role of ACE2 in the renin-angiotensin-system: Etiology and therapy of COVID-19 from a pharmaceutical perspective. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76(8), 342-350.

Nonato, I. C., Barrera, L. H., Solís, C. I. O., Villalobos, D. R., Prado, B. H., & Cervera, S. B. (2021). Epidemiología de la hipertensión arterial en adultos mexicanos: diagnóstico, control y tendencias. *Ensanut 2020. Salud pública de México*, 63(6), 692-704.

Novak, J., Butorac, K., Leboš Pavunc, A., Banić, M., Butorac, A., Lepur, A., ... & Kos, B. (2021). A Lactic Acid Bacteria Consortium Impacted the Content of Casein-Derived Biopeptides in Dried Fresh Cheese. *Molecules*, 27(1), 160.

Okitsu, M., Morita, A., Kakitani, M., Okada, M., & Yokogoshi, H. (1995). Inhibition of the endothelin-converting enzyme by pepsin digests of food proteins. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(2), 325-326.

Olalere, O. A., Yap, P. G., & Gan, C. Y. (2023). Comprehensive review on some food-derived bioactive peptides with anti-hypertension therapeutic potential for angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition. *Journal of Proteins and Proteomics*, 1-33.

Olvera-Rosales, L. B., Cruz-Guerrero, A. E., García-Garibay, J. M., Gómez-Ruíz, L. C., Contreras-López, E., Guzmán-Rodríguez, F., & González-Olivares, L. G. (2022). Bioactive peptides of whey: Obtaining, activity, mechanism of action, and further applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-31.

Olvera-Rosales, L. B., Cruz-Guerrero, A. E., Jaimez-Ordaz, J., Pérez-Escalante, E., Quintero-Lira, A., Ramírez-Moreno, E., ... & González-Olivares, L. G. (2023). Differences in the Proteolytic System of Lactic Acid Bacteria Affect the Release of DPP-IV Inhibitory Peptides from Whey Proteins. *Dairy*, 4(3), 515-526.

Olvera-Rosales, L. B., Cruz-Guerrero, A. E., Ramírez-Moreno, E., Quintero-Lira, A., Contreras-López, E., Jaimez-Ordaz, J., ... & González-Olivares, L. G. (2021). Impact of the gut microbiota balance on the health–disease relationship: The importance of consuming probiotics and prebiotics. *Foods*, 10(6), 1261.

Pato, U., Johan, V. S., Raidinawan, A. R., Ginting, A. A., & Jaswir, I. (2020). Viability and quality of fermented milk made using local and commercial starters during fermentation and

cold storage. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 22(6), 1473-1485.

Pedrosa, M. C., Golner, B. B., Goldin, B. R., Barakat, S., Dallal, G. E., & Russell, R. M. (1995). Survival of yogurt-containing organisms and *Lactobacillus gasserii* (ADH) and their effect on bacterial enzyme activity in the gastrointestinal tract of healthy and hypochlorhydric elderly subjects. *The American journal of clinical nutrition*, 61(2), 353-359.

Perdigon, G., Alvarez, S., Nader de Macias, M. E., Savoy de Giori, G., Medici, M., & Nunez de Kairuz, M. (1991). Behaviour of natural and heated yogurt in the immune system and preventive capacity on enteric infections. *Milchwissenschaft*, 46(7), 411-416.

Pihlanto, A., Virtanen, T., & Korhonen, H. (2010). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *International Dairy Journal*, 20(1), 3-10.

Pihlanto-Leppälä, A., Pahkala, E., & Antila, V. (1993). Hydrolysis of  $\kappa$ -casein in solution by chymosin, plasmin, trypsin and *Lactobacillus*-proteinases. *Agricultural and Food Science*, 2(6), 489-496.

Poolman, B., Kunji, E. S., Hagting, A., Juillard, V., & Konings, W. N. (1995). The proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 79, S65-S75.

Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Alexandre, A., &

Recio, I. (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal*, 17(1), 33-41.

Ramirez-Godinez, J., Gutiérrez-Rodríguez, J. F., Contreras-Lopez, E., Rodríguez-Serrano, G. M., Castaneda-Ovando, A., Jaimez-Ordaz, J., & González-Olivares, L. G. (2021). Agave juice improves survival and proteolytic activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG during ripening of semi-ripened Mexican cheese. *Food Science and Technology*, 42, e30820.

Rodríguez-Serrano, G. M., Garcia-Garibay, J. M., Cruz-Guerrero, A. E., del Carmen Gomez-Ruiz, L., Ayala-Nino, A., Castaneda-Ovando, A., & Gonzalez-Olivares, L. G. (2018). Proteolytic system of *Streptococcus thermophilus*.

Rokka, T., Syväoja, E. L., Tuominen, J., & Korhonen, H. J. (1997). Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of *Lactobacillus* GG fermented UHT-milk.

Rossier, B. C., Bochud, M., & Devuyst, O. (2017). The hypertension pandemic: an evolutionary perspective. *Physiology*, 32(2), 112-125.

Rubak, Y. T., Nuraida, L., Iswantini, D., & Prangdimurti, E. (2020). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in milk fermented by indigenous lactic acid bacteria. *Veterinary World*, 13(2), 345.

- Rutella, G. S., Tagliacozzi, D., & Solieri, L. (2016). Survival and bioactivities of selected probiotic lactobacilli in yogurt fermentation and cold storage: New insights for developing a bi-functional dairy food. *Food Microbiology*, *60*, 54-61.
- Samtiya, M., Samtiya, S., Badgujar, P. C., Puniya, A. K., Dhewa, T., & Aluko, R. E. (2022). Health-promoting and therapeutic attributes of milk-derived bioactive peptides. *Nutrients*, *14*(15), 3001.
- Şanlı, T., Akal, H. C., Yetişemiyen, A., & Hayaloglu, A. A. (2018). Influence of adjunct cultures on angiotensin-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity, organic acid content and peptide profile of kefir. *International Journal of Dairy Technology*, *71*(1), 131-139.
- Santiago-López, L., Hernández-Mendoza, A., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., Vallejo-Cordoba, B., & González-Córdova, A. F. (2015). The effects of consuming probiotic-fermented milk on the immune system: A review of scientific evidence. *International Journal of Dairy Technology*, *68*(2), 153-165.
- Sarvari, F., Mortazavian, A. M., & Fazeli, M. R. (2014). Biochemical characteristics and viability of probiotic and yogurt bacteria in yogurt during the fermentation and refrigerated storage. *Applied Food Biotechnology* *1*(1), 55-61.
- Satılmış, M. K., Öztürk, H. İ., Demirci, T., Denkaş, B., & Akın, N. (2023). Revealing the proteolytic characteristics of lactobacillus, lacticaseibacillus, and lactiplantibacillus isolates by in vitro and in situ perspectives. *Food Bioscience*, *55*, 103086.
- Savaiano, D. A., & Hutkins, R. W. (2021). Yogurt, cultured fermented milk, and health: A systematic review. *Nutrition reviews*, *79*(5), 599-614.
- Schmieder, R. E., Hilgers, K. F., Schlaich, M. P., & Schmidt, B. M. (2007). Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *The Lancet*, *369*(9568), 1208-1219.
- Sebastián-Nicolas, J. L., Contreras-López, E., Ramírez-Godínez, J., Cruz-Guerrero, A. E., Rodríguez-Serrano, G. M., Añorve-Morga, J., ... & González-Olivares, L. G. (2021). Milk fermentation by *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG and *Streptococcus thermophilus* SY-102: Proteolytic profile and ace-inhibitory activity. *Fermentation*, *7*(4), 215.
- Serra, M., Trujillo, A. J., Guamis, B., & Ferragut, V. (2009). Proteolysis of yogurts made from ultra-high-pressure homogenized milk during cold storage. *Journal of Dairy Science*, *92*(1), 71-78.
- Shah, N. P., Lankaputhra, W. E., Britz, M. L., & Kyle, W. S. (1995). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *International dairy journal*, *5*(5), 515-521.
- Sharifi-Rad, J., Rodrigues, C. F., Stojanović-Radić, Z., Dimitrijević, M., Aleksić, A., Neffe-Skocińska, K., ... & Calina, D. (2020).

Probiotics: versatile bioactive components in promoting human health. *Medicina*, 56(9), 433.

Sharma, H., Ozogul, F., Bartkiene, E., & Rocha, J. M. (2023). Impact of lactic acid bacteria and their metabolites on the techno-functional properties and health benefits of fermented dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(21), 4819-4841.

Solanki, D., Sakure, A., Prakash, S., & Hati, S. (2022). Characterization of Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) inhibitory peptides produced in fermented camel milk (Indian breed) by *Lactobacillus acidophilus* NCDC-15. *Journal of Food Science and Technology*, 1-11.

Solomons, N. W. (2002). Fermentation, fermented foods and lactose intolerance. *European journal of clinical nutrition*, 56(4), S50-S55.

Spellman, D., McEvoy, E., O'cuinn, G., & FitzGerald, R. J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International dairy journal*, 13(6), 447-453.

Sumalapao, D. E. P., Mesina, J. A. R. T., Cabrera, E. C., & Gloriani, N. G. (2017). Viability kinetics of *Lactobacillus casei* Shirota strain in a commercial fermented milk drink during refrigerated storage. *National Journal*

*of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 7(11), 1242-1246.

UG, Y., Bhat, I., Karunasagar, I., & BS, M. (2019). Antihypertensive activity of fish protein hydrolysates and its peptides. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(15), 2363-2374.

Vargas-Bello-Pérez, E., Márquez-Hernández, R. I., & Hernández-Castellano, L. E. (2019). Bioactive peptides from milk: Animal determinants and their implications in human health. *Journal of Dairy research*, 86(2), 136-144.

Velez, E., Novotny-Nuñez, I., Correa, S., Perdigón, G., & Maldonado-Galdeano, C. (2021). Modulation of gut immune response by probiotic fermented milk consumption to control IgE in a respiratory allergy model. *Beneficial Microbes*, 12(2), 175-186.

Yamamoto, N., Maeno, M., & Takano, T. (1999). Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *Journal of Dairy Science*, 82(7), 1388-1393.

Zendeboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A. M., & da Cruz, A. G. (2020). Probiotic: conceptualization from a new approach. *Current Opinion in Food Science*, 32, 103-123.