



LIBERACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS POR BACTERIAS LÁCTICAS EN LECHES FERMENTADAS COMERCIALES

BIOACTIVE PEPTIDES RELEASED BY LACTIC ACID BACTERIA IN COMMERCIAL FERMENTED MILKS

L.G. González-Olivares, J. Jiménez-Guzmán, A. Cruz-Guerrero*,
G. Rodríguez-Serrano, L. Gómez-Ruiz y M. García-Garibay

Departamento de Biotecnología Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,
Av. San Rafael Atlixco No. 186. Col. Vicentina, México D.F. 09340, México. CP 09340, México, D.F.

Recibido 16 de Marzo 2011; Aceptado 13 de Abril 2011

Resumen

El objetivo de este estudio fue determinar la concentración y el perfil de pesos moleculares de los péptidos bioactivos encriptados en las proteínas de la leche y liberados por la actividad proteolítica de bacterias lácticas en leches fermentadas comerciales, durante su almacenamiento refrigerado. La concentración de péptidos varió de 0.05 mg/ml en LF-3 (*Lactobacillus casei*) y LF-4 (*Lactobacillus acidophilus*), a 0.227 mg/ml en LF-5 (*Lactobacillus casei* y *S. thermophilus*) y LF-1 (*Lactobacillus casei*) en el décimo día de almacenamiento, en el cual se presentó el máximo de concentración. Durante el almacenamiento refrigerado de todas las muestras, se encontraron péptidos de peso molecular menor a 14.4 kDa. La leche fermentada con *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* (LF-2) presentó la mayor diversidad de péptidos, y en ésta se encontraron fragmentos aún menores a 1.4 kDa, algunos de ellos con aminoácidos aromáticos, presentes en la estructura primaria de péptidos antihipertensivos. Estos resultados sugieren que la concentración y diversidad de péptidos depende del microorganismo que fermenta la leche. El peso molecular de los péptidos encontrados se comparó con los reportados en la literatura como péptidos bioactivos, y se encontraron semejanzas, lo que incrementa la probabilidad de tener péptidos de importancia fisiológica en leches fermentadas.

Palabras clave: leches fermentadas, péptidos bioactivos, efecto antihipertensivo, bacterias ácido lácticas.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the release of bioactive peptides encrypted in milk proteins by proteolytic activity of lactic acid bacteria in commercial fermented milks in refrigerated storage. Peptide concentration varied from 0.05 mg / ml in LF-3 (*Lactobacillus casei*) and LF-4 (*Lactobacillus acidophilus*) to 0.227 mg / ml in LF-5 (*Lactobacillus casei* and *S. thermophilus*) and LF-1 (*Lactobacillus casei*) after 10 days of storage, when the maximum concentration was reached. During refrigerated storage, all samples presented peptides with molecular weight lower than 14.4 kDa. The fermented milk LF-2 (*Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus*) had the highest variety of peptides, and even peptides lower than 1.4 kDa were found, some of them with aromatic amino acids, which are present in the primary structure of antihypertensive peptides. These results suggest that the concentration and diversity of peptides depends on microorganism in the fermented milk. Peptides molecular weights were compared with those reported in literature for bioactive peptides, finding similarities, thus increasing the expectations to have peptides with physiological importance in fermented milks.

Keywords: fermented milks, bioactive peptides, antihypertensive effect, lactic acid bacteria.

*Autora para la correspondencia. E-mail: aec@xanum.uam.mx
Tel: (55) 58 04 47 20; Fax: (55) 58 04 47 12

1 Introducción

Durante décadas las leches fermentadas se han considerado productos benéficos para la salud, esto se ha atribuido a los microorganismos involucrados en la fermentación. Estudios recientes han comprobado que estos beneficios también se deben a los diferentes productos liberados durante el proceso de fermentación, tales como metabolitos y otras moléculas biológicamente activas (Leroy y De Vuyst, 2004; Figueroa-González y col., 2010).

Los probióticos se han definido como organismos vivos que al ingerirse afectan benéficamente al huésped mejorando el balance intestinal (Simmering y Blaut, 2001). Al modificar la microflora 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 (Senok y col., 2005). Una gran variedad de especies y géneros pueden ser considerados como probióticos potenciales; sin embargo, comercialmente, las bacterias ácido lácticas (BAL) son las más importantes (Vasiljevic y Shah, 2008).

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; algunos de estos péptidos presentan actividad biológica por lo que son considerados péptidos bioactivos. A partir de leches fermentadas se han aislado numerosos péptidos con diversas actividades biológicas. Se han descrito fracciones péptidicas con actividad inmunomodulante (LeBlanc y col., 2002), anticancerígena (LeBlanc y col., 2005), hipocolesterolémica (Kawase y col., 2000), antimicrobiana (Hernández y col., 2005), acarreadora de minerales (Lorenzen and Meisel, 2005), reguladora de actividad intestinal y del sistema nervioso (Rokka y col., 1997) y antioxidante (Hernández-Ledezma y col., 2005). Los péptidos bioactivos más estudiados hasta el momento son aquellos implicados en el control de la presión arterial (Fitzgerald y Murray, 2006).

El primer reporte de una leche fermentada, con actividad antihipertensiva comprobada, fue producida con una combinación de *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae*; ésta contenía dos tripéptidos inhibidores de enzima la convertidora de angiotensina (VPP e IPP) (Contreras y col., 2009).

Se ha reportado en varios estudios la existencia de péptidos bioactivos en diferentes leches fermentadas: péptidos moduladores de la motilidad intestinal en una leche fermentada con *Lactobacillus casei* ssp. *rhannosus*; péptidos antihipertensivos en yogurt y kéfir (Korhonen, 2009). En este mismo contexto se ha demostrado que diferentes bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*) son capaces de producir péptidos bioactivos durante el proceso de fermentación y durante el almacenamiento en refrigeración (Phelan y col., 2009).

La presencia de estos péptidos bioactivos en productos alimenticios comerciales podría aportar beneficios adicionales para el consumidor. El objetivo de este trabajo fue determinar la concentración y el perfil de pesos moleculares de los péptidos liberados durante el almacenamiento en frío de leches fermentadas comerciales conteniendo diferentes bacterias lácticas.

2 Materiales y métodos

2.1 Leches fermentadas comerciales

Se emplearon 7 leches fermentadas comerciales identificadas en la Tabla 1. Los productos se seleccionaron en base a los microorganismos utilizados para la fermentación, considerando aquellas que tuvieran microorganismos probióticos (siendo el caso de las leches LF-1 a LF-6) mientras que la LF-7 se seleccionó por tener exclusivamente los microorganismos del yogurt. Los productos se compraron en supermercados en las condiciones que llegan al consumidor asegurándose que tuvieran 15 días antes de la fecha de caducidad.

2.2 Separación de los péptidos presentes en las leches fermentadas almacenadas en refrigeración

Las leches fermentadas se almacenaron a 4°C durante 15 d, tomando muestras en los días 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15. Se tomaron 5 ml de muestra y se mezclaron con el mismo volumen de una solución de ácido tricloroacético (TCA J.T. Baker, México) al 12% (p/v) para precipitar proteínas (Jiménez-Guzmán y col., 2002). Se centrifugaron a 18000 rpm durante 15 min a 4°C (centrifuga Beckman J2-MI, EUA). El sobrenadante se refrigeró a 4°C y se utilizó para las determinaciones posteriores.

Tabla 1. Leches fermentadas comerciales

MUESTRA	BACTERIA	DESCRIPCIÓN
LF-1	<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>	Leche fermentada líquida
LF-2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>	Leche fermentada líquida
LF-3	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Leche fermentada líquida
LF-4	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leche fermentada líquida
LF-5	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota y <i>Streptococcus thermophilus</i>	Leche fermentada sólida
LF-6	<i>Bifidobacterium</i> sp, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>	Leche fermentada líquida
LF-7	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>	Yogurt batido

2.3 Cuantificación de péptidos solubles en las leches fermentadas

La liberación de péptidos solubles en las leches fermentadas se realizó mediante la técnica reportada por Lowry y col., (1951), esto se hizo en los sobrenadantes obtenidos previamente. Se adicionó 1 mL del sobrenadante de la leche fermentada a 5 mL de una solución de carbonato de sodio al 2%, sulfato de cobre al 1% y tartrato de sodio y potasio al 2% en NaOH 0.1N; se dejó reposar 10 min en la oscuridad. Posteriormente se adicionaron 0.5 mL del reactivo de Folin diluido 1:1 con agua destilada (preparado al momento de utilizarse), y se dejó reposar 30 min en la oscuridad. Se midió la absorbencia en el espectrofotómetro Shimadzu UV-160 (Japón) a una longitud de onda de 590 nm.

2.4 Electroforesis desnaturizante de las leches fermentadas

Se realizó la electroforesis desnaturizante de acuerdo a Laemmli (1970), con una concentración de acrilamida de 15% (p/v). Se usó un estándar de pesos moleculares de amplio rango (Bio-Rad, EUA): miosina (200,000 Da); β -galactosidasa (116,250 Da); fosforilasa B (97,400 Da); seroalbúmina (66,200 Da); ovoalbúmina (45,000 Da); anhidrasa carbónica (31,000 Da); inhibidor de tripsina (21,500 Da); lisozima (14,400 Da) y aprotinina (6,500 Da). Los geles se tiñeron con Sypro Flamingo (Bio-Rad, EUA). Se generaron los perfiles electroforéticos para cada producto analizado a partir de los geles de

electroforesis, y la altura de los picos en la gráfica corresponde a la concentración de cada péptido.

2.5 Electroforesis desnaturizante de péptidos de LF-2

Se utilizó el método de Schagger y von Jagow (1987) modificado para la mejor resolución de péptidos de peso molecular menor de 10 kDa. Con el objetivo de concentrar los péptidos, los sobrenadantes se liofilizaron (liofilizadora Labconco DrySystem/Freezone 4.5). Los liofilizados se resuspendieron en 100 μ l de agua desionizada, se tomó una alícuota de 40 μ l y se agregaron 20 μ l de solución amortiguadora de corrida (Tris base-tricina 0.1M), se incubaron por 30 min a 40°C. La electroforesis se realizó en un gel con 20% (p/v) de acrilamida y 6% (p/v) de bisacrilamida, se inició con 30 V por 90 min, siguiendo con 95 V por 7 h. La fijación de péptidos en el gel, se hizo con una solución de 50% (p/v) metanol y 10% (p/v) ácido acético por una hora. La tinción se hizo en una solución de Sypro Flamingo (Bio-Rad, EUA) por 30 min, se enjuagó el gel con agua desionizada, para tomar posteriormente la imagen en Gel-Doc 100 (Bio-Rad, EUA).

Para determinar los pesos moleculares, se utilizó el estándar de polipéptidos (Bio-Rad, EUA): triosafosfato isomerasa (26,625 Da); mioglobina (16,950 Da); α -lactoalbúmina (14,437 Da); aprotinina (6,512 Da); insulina B oxidada (3,496 Da) y bacitracina (1,423 Da). Para la determinación de la concentración de péptidos, se tomó como referencia la β -lactoglobulina (BLG) a una concentración de 1

mg/ml.

2.6 Separación de péptidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de exclusión molecular

Los sobrenadantes de las leches fermentadas fueron inyectados en un HPLC (Lab Alliance, EUA) en una columna de exclusión molecular (Biosep-SEC 2000, Phenomenex®, tamaño de partícula 5 μm , tamaño de poro 145 Å, 300 x 7.8 mm). Se utilizó como fase móvil una solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8, se inyectaron 20 μl de muestra. Se corrió a temperatura ambiente, con una tasa de flujo de 1 ml/min durante 60 min. La detección se realizó a 210, 257 y 280 nm en un detector de arreglo de diodos (Spectra System UV 6000 LP). Las dos últimas son las longitudes de onda donde los aminoácidos aromáticos tienen su máxima absorción de luz, a 257 nm fenilalanina (Phe) y 280 nm para tirosina (Tyr) y triptófano (Trp), mientras que a 210 nm absorben los enlaces peptídicos (Creighton, 1990).

2.7 Análisis estadístico

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

3 Resultados y discusión

3.1 Concentración de péptidos solubles producidos en las leches fermentadas durante el almacenamiento

Al realizar la determinación de péptidos solubles (Fig. 1), se encontró que la concentración se incrementó hasta el día diez, a partir del cual se mantuvo constante hasta el final del estudio ($p > 0.05$) excepto para la LF-4 y LF-5 en donde se observó una disminución en la concentración de péptidos. Se observó que la mayoría de las leches fermentadas (exceptuando LF-4 y LF-5) alcanzaron un máximo entre 1300 y 1600 $\mu\text{g/ml}$, mientras que LF-4 alcanzó una concentración de 2500 $\mu\text{g/ml}$ y LF-5 por arriba de los 3000 $\mu\text{g/ml}$; esta última corresponde a la combinación *S. thermophilus* y *L. casei* Shirota. Por otra parte, se

observó que todas las leches fermentadas siguieron la misma tendencia, lo cual sugiere una formación y acumulación constante durante los primeros días del almacenamiento, no importando la bacteria láctica utilizada en la elaboración. Estos resultados coinciden con los reportados por Nielsen y col. (2009) quienes estudiaron la producción de péptidos durante el almacenamiento en refrigeración de leches fermentadas con *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus helveticus* y en cultivos combinados de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus*.

En la Fig. 2 se muestra el gel de electroforesis de las leches fermentadas almacenadas durante 10 d en refrigeración. Se observó que en cada una de las muestras se encontraron bandas con pesos moleculares menores a 14.4 kDa incluso menores a 6.6 kDa, que corresponden al tamaño de varios péptidos reportados como bioactivos (Schanbacher y col., 1997; Meisel y Bockelmann, 1999; Korhonen y Philanto 2006; Phelan y col., 2009).

A partir del gel de electroforesis se calculó la concentración de péptidos y se encontró que los productos que presentaron la mayor concentración no mostraron la mayor diversidad de ellos. En LF-1 y LF-5, que tenían la mayor concentración (0.205 y 0.227 mg/ml), sólo se encontraron 9 y 10 bandas de péptidos respectivamente. En el caso de LF-7 y LF-4, 11 y 12 bandas respectivamente; en LF-2 a pesar de haber tenido una concentración de péptidos menor (0.073 mg/ml) presentó la mayor diversidad de ellos (15 bandas) por debajo de los 14.4 kDa, además de que exhibió uno de los péptidos de menor peso molecular, que son los de mayor interés por ser de los péptidos más reportados en la bibliografía como bioactivos

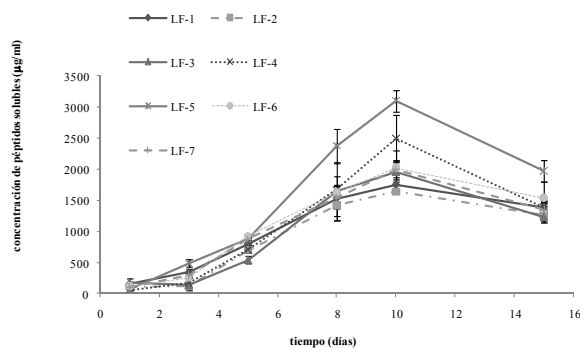


Fig. 1. Producción de péptidos solubles en leches fermentadas refrigeradas.

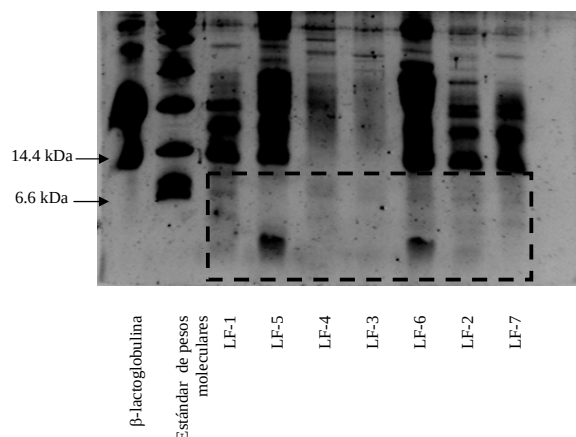


Fig. 2. Electroforésis desnaturalizante de leches fermentadas a 10 días de refrigeración.

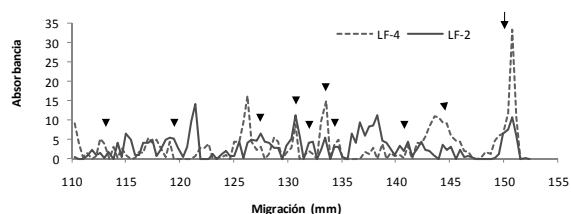


Fig. 3. Comparación del perfil de producción de péptidos de las leches fermentadas con *L. acidophilus* a partir del análisis de imagen de los geles de electroforesis. Las flechas indican puntos de coincidencia en los péptidos encontrados.

entre los que se encuentran: antitrombóticos, antihipertensivos, inmunomoduladores, acarreadores de minerales entre otros (Clare y Swaisgood, 2000). Otros autores han descrito la capacidad de las proteinasas de las BAL para hidrolizar más del 40% de los enlaces peptídicos de las caseínas (Juillard y col., 1995; Kunji y col., 1996; Mierau y col., 1997) generando un gran número de péptidos, que podrían ser degradados por peptidasas para liberar algunos con propiedades bioactivas.

Se comparó el perfil de péptidos de las leches fermentadas y se observaron picos que coinciden entre ellas. En el caso de LF-2, LF-5 y LF-7 que tienen en común la presencia de *Streptococcus thermophilus*, se encontraron cinco picos que coinciden entre los tres productos. Lo mismo se observa entre los perfiles de LF-3 y LF-5, fermentadas con la misma cepa de *L. casei*, donde se encontraron ocho picos que coinciden. Por otro lado, en el caso de LF-4 y LF-2 fermentadas con *L. acidophilus* (Fig. 3), se encontró la mayor cantidad de picos comunes (10 picos) lo que coincide con lo reportado por

Vinderola y col. (2002) quienes observaron que en almacenamiento a 4°C, la producción de péptidos fue mayor en una leche fermentada con *L. acidophilus* y *S. thermophilus* comparada con leches fermentadas con otros probióticos solos o en otras combinaciones. Es importante destacar que es posible relacionar el tipo de péptido encontrado con el sistema proteolítico de la bacteria o del consorcio bacteriano utilizado en la fermentación de la leche (LeBlanc, y col., 2002). En leches fermentadas en refrigeración, se ha observado que algunos consorcios bacterianos generan mayor producción de péptidos y aminoácidos libres que cuando se tiene una sola bacteria (Shihata y Shah, 2000).

3.2 Determinación de péptidos solubles en LF-2 elaborada con *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus*

A partir de los resultados obtenidos se trabajó con LF-2 debido a la variedad de péptidos generados comparado con el resto de los productos analizados. Con el fin de determinar si la concentración de péptidos era igual para cualquier lote de leche LF-2, se analizaron dos muestras con diferentes tiempos de elaboración 15 y 10 días antes de caducar y no se encontró diferencia en la concentración de péptidos en ambos productos ($p > 0.05$).

Al realizar la electroforesis para péptidos de las muestras de LF-2 en almacenamiento refrigerado, se encontraron bandas correspondientes a péptidos menores a 14.4 kDa (Fig. 4), se observó que en todos los carriles hubo aparición de estas bandas, pero existen dos bandas en particular bien definidas una de 1.4 kDa (a) y otra menor a 1.4 kDa (b), que aparecieron en el día 1 y permanecieron hasta el día 13, estos resultados confirman la existencia de péptidos de bajo peso molecular que se habían encontrado en el análisis por electroforesis desnaturalizante de las leches fermentadas. Esta formación de péptidos puede deberse, en gran medida, a que existen aún en el medio endopeptidasas pertenecientes a bacterias vivas o a enzimas liberadas por lisis celular (Nighswonger y col., 1996). Nielsen y col. (2009) encontraron, en estudios hechos durante el almacenamiento refrigerado en leches fermentadas, que la actividad proteolítica se mantuvo en refrigeración a 4°C y que aún cuando no hubo un aumento considerable de la población de BAL, la actividad proteolítica no se detuvo, permitiendo un aumento en la concentración de péptidos de distintos pesos moleculares.

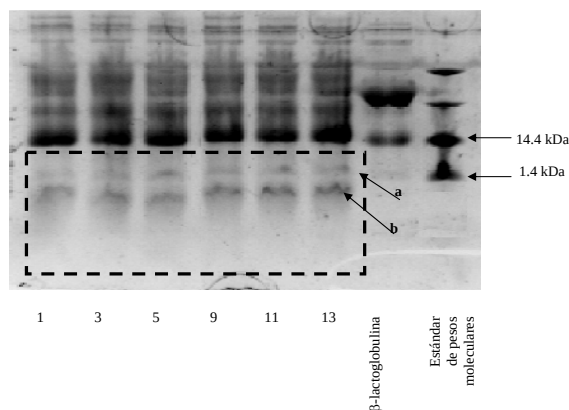


Fig. 4. Electroforesis de LF-2 durante el almacenamiento en refrigeración. Día 1 (1); día 3 (3); día 5 (5); día 9 (9); día 11 (11); día 13 (13); a (péptido de 1.4 kDa); b (péptido menor de 1.4 kDa)

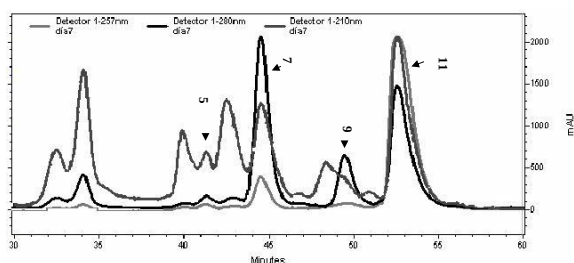


Fig. 5. Comparación de cromatogramas obtenidos de HPLC en columna de exclusión leídos a diferentes longitudes de 210, 257 y 280 nm.

Los resultados obtenidos de la separación e identificación de las fracciones peptídicas de la leche LF-2 por HPLC se muestran en la Tabla 2. En el primer día de monitoreo se identificaron 7 péptidos menores a 14.4 kDa y se observó que la concentración total de péptidos permaneció constante ($p > 0.05$) hasta el día 5 a pesar de que sí hubo un aumento en el número de péptidos. Se observó un aumento en la concentración de péptidos en el día 7 y otro hasta el día 13 siendo éste el máximo obtenido ($p < 0.05$). Los péptidos generados pueden provenir de la hidrólisis de proteínas o péptidos de peso molecular superior a 10 kDa por las enzimas del sistema proteolítico de las BAL (Ramchandran y Shah, 2008; Nighswonger y col., 1996). Los péptidos 7 y 11 fueron los que se encontraron en mayor concentración al final del estudio, con pesos moleculares de 2.68 y 0.87 kDa respectivamente. Los péptidos encontrados menores a 2 kDa pueden estar relacionados con péptidos antihipertensivos, debido solamente a su peso molecular. Muchos autores han reportado péptidos de menos de 2 kDa biológicamente activos (Meisel, 1998;

Meisel, 2001; Clare y Swaisgood, 2000; Rokka y col., 1997).

Comparando los cromatogramas del sobrenadante de la LF-2 a las tres longitudes de onda (Fig. 5), sólo se observaron cuatro péptidos con presencia de aminoácidos aromáticos. Dado que diferentes autores reportaron que los péptidos antihipertensivos, tienen en sus estructuras aminoácidos aromáticos (Rokka y col., 1997) se incrementa la posibilidad de encontrar péptidos antihipertensivos. Se ha visto que los aminoácidos Trp, Tyr y Phe favorecen la unión y consecuente inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE-I) (Cheung y col., 1980). De igual manera se sabe que el sistema proteolítico de las BAL está íntimamente ligado a la acumulación de péptidos de diferentes tamaños y tipos, dependiendo de las necesidades nutricionales de cada BAL, haciendo que las diferencias funcionales del aparato proteolítico entre *L. acidophilus* y *S. thermophilus*, sea una de las causas de encontrar esta diversificación en las fracciones peptídicas (Poolman y col., 1995). Aún cuando la temperatura óptima de las proteinasas y peptidasas de las BAL se encuentra entre 25 y 37°C (Juille y col., 2005) la actividad continúa en refrigeración, tanto en el rompimiento de proteínas como de péptidos (Nighswonger y col., 1996; Nielsen y col., 2009). Más aún se ha reportado (Matsumura y col., 1993; Miyoshi y col., 1991; Fujita y col., 2000) la importancia de la presencia de aminoácidos aromáticos, principalmente Phe, junto con prolina en péptidos con alta actividad inhibitoria de la ACE, en el extremo C-terminal. Debido a los requerimientos nutricionales de las BAL, se tiene una acumulación de péptidos de cadena corta (2 a 6 aminoácidos) (Dave y Shah 1998; Gomes y col., 1998). Aunque los requerimientos nutricionales del estreptococo son diferentes (Letort y col., 2002) y tienen un sistema muy avanzado a manera de operón de producción de aminoácidos (leucina, isoleucina y valina) (Garault y col., 2000) también genera péptidos de bajo peso molecular en leches fermentadas, además de que la nula necesidad de péptidos aromáticos permite la acumulación de estos en el medio de fermentación (Akpemado y Bracquart 1983; Letort y Julliard 2001) a diferencia del lactobacilo, el cual tiene necesidades de fenilalanina y triptófano (Morishita y col., 1981). De igual manera la acumulación constante de péptidos con aminoácidos aromáticos, se puede deber a una peptidasa intracelular específica del estreptococo, que libera de manera constante péptidos con fenilalanina (Fernández-Esplá y Rul 1999) cuyo sistema de

Tabla 2. Péptidos menores de 8 kDa encontrados en leche LF-2 en almacenamiento refrigerado

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

Tabla 3. Relación de péptidos encontrados con péptidos reportados.

Peso péptido encontrado (Da)	Peso péptido reportado (Da)	Posible origen	Posible función	Referencia
2681.37	2662.0	β -CN f(128-149)	ACE-I	Robert y col. (2004)
1429.73	1448.4	β -CN f(94-106)	ACE-I	Quirós y col. (2005)
870.76	872.5	α_{s1} -CN f(157-164)	ACE-I	Contreras y col. (2009)
	865.37	β -CN f(98-105)		Hernández-Ledezma y col. (2004)

β -CN: β -caseína; α_{s1} -CN: α_{s1} -caseína; ACE-I: inhibidor de enzima convertidora de angiotensina

transporte de oligopéptidos tiene afinidad por péptidos de hasta 23 aminoácidos, además de poseer tres enzimas ligadoras en el sistema de transporte de oligopéptidos (amiA1, amiA2 y amiA3) en lugar de una como en las demás BAL (OppA) (Garault y col., 2001; Fernández-Esplá y Rul 1999, Juille y col., 2005) que le permite excretar al medio péptidos de dos y tres aminoácidos generados por la acción de dipeptidasas intracelulares (Rul y Monnet 1997; Fernández-Esplá y Rul, 1999).

3.3 Relación de péptidos encontrados con péptidos bioactivos reportados

Se pudo hacer una relación de los péptidos encontrados en el estudio (con aminoácidos aromáticos en su estructura) con péptidos bioactivos reportados, tal y como lo hicieron Rokka y col. (1997); de esta forma se identificaron tres péptidos que podrían tener actividad biológica, principalmente antihipertensiva, ya que los pesos moleculares reportados son muy similares a los pesos moleculares determinados y en ellos hay presencia de Tyr, Phe y Trp (ver Tabla 3).

Conclusiones

En todas las leches fermentadas estudiadas se observó la generación de péptidos solubles durante el almacenamiento en refrigeración independientemente del microorganismo utilizado en su elaboración, y se observó que siguió un mismo patrón, con un máximo de concentración en el día 10 que se mantuvo constante hasta el final del estudio, exceptuando la de las leches LF-4 (*Lactobacillus acidophilus*) y LF-5 (*Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*), en las que se presentó un descenso después del día 10 hasta el día 15.

El análisis de péptidos por electroforesis desnaturante de todas las leches comerciales, reveló que las leches que presentaron la mayor concentración de péptidos fueron las que tenían *Lactobacillus casei* (LF-1 y LF-5). Mientras que, las leches que tenían *Lactobacillus acidophilus* (LF-2 y LF-4) presentaron la mayor diversidad de péptidos. La comparación del perfil de péptidos permitió comprobar que los péptidos generados dependen del microorganismo utilizado en la fermentación.

En la leche fermentada con *Lactobacillus*

acidophilus y *Streptococcus thermophilus* (LF-2) se logró identificar la formación de péptidos menores de 1.4 kDa, los cuales se conservaron durante el almacenamiento en refrigeración, en particular un péptido de 0.87 kDa, que al igual que los péptidos de 1.4 y 2.68 kDa, contenían aminoácidos aromáticos, que se ha reportado deben estar presentes en péptidos antihipertensivos, elevando la probabilidad de que estos péptidos tengan esta función biológica.

Referencias

- Akpemado, K.M. y Bracquart, P.A. (1983). Uptake of branched-chain amino acids by *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 136-140.
- Cheung, H. S., Wang, F. L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F. y Cushman, D. W. (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 255, 401-407.
- Clare, D. A. y Swaisgood, H.E. (2000). Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of Dairy Science* 83, 1187-1195.
- Contreras, M., Carrón, R., Montero, M.J., Ramos, M. y Recio, I. (2009). Novel-casein derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal* 19, 566-573.
- Creighton, T.E. (1990). Protein folding. *Biochemistry Journal* 270, 1-16.
- Dave, R.I. y Shah, N.P. (1998). Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *Journal of Dairy Science* 81, 2804-2816.
- Fernández-Espla, M.D. y Rul, F. (1999). PepS from *Streptococcus thermophilus* a new member of the aminopeptidases family of thermophilic bacteria. *European Journal of Biochemistry* 263, 502-510.
- Figueroa-González, I., Hernández-Sánchez, H., Rodríguez-Serrano G., Gómez-Ruiz L., García-Garibay M. y Cruz-Guerrero A. (2010). Antimicrobial effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota co-cultivated with *Escherichia coli* UAM0403. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 9, 11-16.
- Fitzgerald, R. y Murray, B. A. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology* 59, 118-125.
- Fujita, H., Yokoyama, K. y Yoshikawa, M. (2000). Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *Journal of Food Science* 65, 564-569.
- Garault, P., Letort, C., Juillard, V. y Monnet, V. (2000). Branched-chain amino acid biosynthesis essential for optimal growth of *Streptococcus thermophilus* in milk. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 5128-5133.
- Garault, P., Letort, C., Juillard, V. y Monnet, V. (2001). La biosynthèse des acides aminés à chaîne branchée et des purines: deux voies essentielle pour une croissance optimale de *Streptococcus thermophilus* dans le lait. *Lait* 81, 83-90.
- Gomes, A.M.P., Malcata F.X. y Klaver, F.A.M. (1998). Growth enhancement of *Bifidobacterium lactis* B0 and *Lactobacillus acidophilus* by milk hydrolysates. *Journal of Dairy Science* 81, 2817-2825.
- Hernández, D., Cardell, E. y Zarate, V. (2005). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology* 99, 77-84.
- Hernández-Ledezma, B., Amigo, L., Ramos, M. y Recio, I. (2004). Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 1504-1510.
- Hernández-Ledezma, B., Miralles, B., Amigo, L., Ramos, M. y Recio, I. (2005). Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 1041-1048.
- Jiménez-Guzmán J., Cruz-Guerrero A., Rodríguez-Serrano G., López-Munguía A., Gómez-Ruiz L. y García-Garibay, M. (2002). Enhancement of

- lactase activity in milk by reactive sulfhydryl groups induced by heat treatment. *Journal of Dairy Science* 85, 2497-2502.
- Juillard, V., Laan, H., Kunji, E. R. S., Jeronimus-Stratingh, C. M., Bruins, A. P. y Konings, W. N. (1995). The extracellular PI-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes β -casein into more than one hundred different oligopeptides. *Journal of Bacteriology* 177, 3472-3478.
- Juille, O., Le Bars, D. y Juillard, V. (2005). The specificity of oligopeptide transport by *Streptococcus thermophilus* resembles that of *Lactococcus lactis* and not that of pathogenic streptococci. *Microbiology* 151, 1987-1994.
- Kawase, M., Hashimoto, H., Hosoda, M., Morita, H. y Hosono, A. (2000). Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure. *Journal of Dairy Science* 83, 255-263.
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods* 1, 177-187.
- Korhonen, H. y Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal* 16, 945-960.
- Kunji, E. R. S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B. y Konings, W. N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 187-221.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LeBlanc, J. G., Matar, C., Valdéz, J. C. Leblanc, J. y Perdigón, G. (2002). Immunomodulatory effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science* 85, 2733-2742.
- LeBlanc, A. D., Matar, C., LeBlanc, N. y Perdigón, G. (2005) Effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 on a murine breast cancer model. *Breast Cancer Research* 7, R477-R486.
- Leroy, F. y De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology* 15, 67-78.
- Letort, C. y Juillard, V. (2001). Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Applied Microbiology* 91, 1023-1029.
- Letort, C., Nardi, M., Garault, P., Monnet, V. y Juillard V. (2002). Casein utilization by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3162-3165.
- Lorenzen, P. C. y Meisel, H. (2005). Influence of trypsin action in yoghurt milk on the release of caseinophosphopeptide-rich fractions and physical properties of the fermented products. *International Journal of Dairy Technology* 58, 119-124.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Matsumura, N., Fujii, M., Takeda, Y., Sugita, K. y Shimizu, T. (1993) Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 57, 1743-1744.
- Meisel, H. (1998). Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal* 8, 363-373.
- Meisel, H. (2001). Bioactive peptides from milk proteins: a perspective for consumers and producers. *The Australian Journal of Dairy Technology* 56, 83-92.
- Meisel, H. y Bockelmann, W. (1999). Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and tropho-functional properties. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 297-215.
- Mierau, I., Kunji, E. R. S., Venema, G. y Kok, J. (1997). Casein and peptide degradation in lactic acid bacteria. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 14, 279-301.
- Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H. y Maruyama, S. (1991). Structures and activity of angiotensin-converting enzyme

- inhibitors in an alpha-zein hydrolysate. *Agricultural and Biological Chemistry* 55, 1313- 318.
- Morishita, T., Deguchi, Y., Yajima, M., Sakurai, T. y Yura, T. (1981). Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *Journal of Bacteriology* 148, 64-71.
- Nielsen, M., Martinussen, T., Flambard, B., Sorensen, K. y Otte, J. (2009). Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: effect of bacterial strain, fermentation, pH and storage time. *International Dairy Journal* 19, 155-165.
- Nighswonger, B.D., Brashears, M. M. y Gilliland, S. E. (1996). Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science* 79, 212-219.
- Phelan, M., Aherne, A., Fitzgerald, R. y O'Brien, N. (2009). Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal* 19, 643-654.
- Poolman, B., Kunji, E.R.S., Hagting, A., Juilliard, V. y Konings, W. N. (1995). The proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* 79, 65S-75S.
- Quirós, A., Hernández-Ledezma, B., Ramos, M., Amigo, L. y Recio, I. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *Journal of Dairy Science* 88, 3480-3487.
- Ramchandran, L. y Shah, N.P. (2008). Proteolytic profiles and angiotensin-I converting enzyme and α -glucosidase inhibitory activities of selected lactic acid bacteria. *Journal of Food Science* 73, M75-M81.
- Robert, M.C., Razaname, A., Mutter, M. y Juillerat, M.A. (2004). Identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 6923-6931.
- Rokka, T., Syvaaja, E. L., Tuominen, J. y Korhonen, H. (1997). Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of *Lactobacillus* GG fermented UHT milk. *Milchwissenschaft* 52, 675-678.
- Rul, F. y Monnet, V. (1997). Presence of additional peptidases in *Streptococcus thermophilus* CNRZ 302 compared to *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology* 82, 695-704.
- Schägger, H. y von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium-dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166, 368-379.
- Schanbacher, F. L., Talhouk, R.S. y Murray, F.A. (1997). Biology and origin of bioactive peptides in milk. *Livestock Production Science* 50, 105-123.
- Senok, C.A., Ismaeel, Y. A. y Botta, G.A. (2005). Probiotics: facts and myths. *Clinical Microbiology and Infection* 11, 958-966.
- Shihata, A. y Shah, N. P. (2000). Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 10, 401-408.
- Simmering, R. y Blaut, M. (2001). Pro- and prebiotics- the tasty guardian angels? *Applied Microbiology and Biotechnology* 55, 19-28.
- Vasiljevic, T. y Shah, N. P. (2008). Probiotics -From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal* 18, 714-728.
- Vinderola, C.G., Mocchiutti, P. y Reinheimer, J. A. (2002). Interactions among lactic acid started and probiotic bacteria used for ferment dairy products. *Journal of Dairy Science* 85, 721-729.