



Péptidos bioactivos de suero de
leche y caseínas liberados por la
actividad proteolítica de
Lactobacillus casei Shirota y
Streptococcus thermophilus

TESIS

Que para obtener el grado de Doctora en Biotecnología

PRESENTA

M. B. María Rebeca Rojas Ronquillo

DIRECTOR:

Dr. J. Mariano García Garibay

ASESORES:

Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano

Dra. Carmen Wachter Rodarte

Péptidos bioactivos de suero de leche y caseínas liberados por la actividad proteolítica de
Lactobacillus casei Shirota y *Streptococcus thermophilus*

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el
Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT con la referencia 001466 .

México, D. F. a 29 de noviembre de 2012.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

Péptidos bioactivos de suero de leche y caseínas liberados por la actividad proteolítica de *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*.

Que presentó

M.B. María Rebeca Rojas Ronquillo

Director:

Dr. J. Mariano García Garibay

Jurado:

Dra. Lilia Arely Prado Barragán (Presidente)

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero (Secretario)

Dra. Gabriela Mariana Rodriguez Serrano

Dra. Carmen Wachter Rodarte

“Más aún, quien con espíritu humilde y ánimo constante se esfuerza por escrutar lo escondido de las cosas, aun sin saberlo, esta como guiado por la mano de Dios, que, sosteniendo todas las cosas, hace que sean lo que son.”

Gaudium et spes,
Concilio Vaticano II,
7 de diciembre de 1965.

Gracias

A todos los que en estos años me han apoyado y animado...

A Daniel (mi reycito), te amo mi vida, gracias por tu comprensión y amor;

*A mi Papá chulo, mi sacro-santa Amá, Abby y Aimecita, por ustedes soy como soy;
mis abuelitos, mis tíos, mis primitos, los quiero mucho, tengo una familia maravillosa!
Todos en la planta piloto:2 por la compañía, por el buen ambiente, que se pone barbaro.
A la Dra. Alma, que me guió y apoyó incondicionalmente, y se volvió mi modelo a seguir.
a Dios por ponerme donde estoy, por darme una vida maravillosa llena de retos y de amor.*

*Agradezco de forma especial a las Dras. Arely Prado, Carmen Wachter, Gaby Rodríguez y
Alma Cruz, por su paciencia, consejos y apoyo durante la revisión de esta tesis.*

Resumen / Abstract

Se analizaron muestras de las fermentaciones en suero de leche y caseínas por *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*; durante las cuatro fermentaciones se monitoreo el crecimiento, el pH y la concentración de grupos amino libres (como indicador de la proteólisis). Se determinó la capacidad de inhibir a la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y de evitar la formación de un coágulo hemático inhibiendo la acción de la trombina sobre el fibrinógeno, de las muestras tomadas durante las fermentaciones. Las muestras que presentaron mayor capacidad de inhibición de la ACE fueron las de la fermentación en suero de leche con ambas bacterias; en el caso de la actividad antitrombótica sólo se observó actividad durante la fermentación en caseínas por *Lactobacillus casei* Shirota. En cada caso muestras de fermentación fueron analizadas por HPLC, primero por exclusión molecular y posteriormente por fase reversa. Se purificaron péptidos obtenidos durante las fermentaciones de suero de leche y caseínas por *Lactobacillus casei* Shirota. Se probó la resistencia de los péptidos purificados a las enzimas gástricas pepsina y tripsina. Se identificaron dos péptidos inhibidores de la ACE y cinco inhibidores de la trombina. El único péptido generado a partir de la caseína fue YQEPVLGPVRGPFPIIV, reportado como multifuncional el resto de los péptidos se generaron de proteínas constitutivas de *Lactobacillus casei*. Estas bioactividades permanecieron después de la digestión con las enzimas gástricas.

Samples from fermentations of whey and casein by *Lactobacillus casei* Shirota and *Streptococcus thermophilus* were analyzed. During the four fermentations growth, pH and concentration of free amino groups were followed as an indicator of proteolysis. The ability to inhibit angiotensin converting enzyme (ACE) and preventing clot formation by inhibiting the action of thrombin on fibrinogen from samples taken during fermentation was determined. The samples showed the highest ability of ACE inhibition were those of whey fermentation with both bacteria. Antithrombotic activity was observed only during the casein fermentation by *Lactobacillus casei* Shirota. The purification of peptides was first by exclusion chromatography and then by reverse phase. The purified peptides were from the fermentation of whey and casein for *Lactobacillus casei* Shirota. The resistance of the purified peptides to gastric enzymes (pepsin and trypsin) was tested. Two ACE inhibitors peptides and five thrombin inhibitors were identified. Only the peptide YQEPVLGPVRGPFPIIV was generated from casein, this has been reported as multifunctional, while the rest of the peptides were generated from proteins of *Lactobacillus casei*. *Lactobacillus casei* Shirota produce ACE inhibitory peptides and inhibitory clot formation peptides from caseins and from their own cell-wall proteins. These bioactivities remained after digestion with gastric enzymes.

Índice

Resumen / Abstract	v
Introducción	1
Antecedentes	2
Péptidos bioactivos.....	2
<i>Funciones de los péptidos bioactivos</i>	3
Actividad antihipertensiva.....	7
Actividad antitrombótica	10
Biodisponibilidad de péptidos bioactivos	13
Producción de péptidos bioactivos	16
<i>Fermentación con bacterias ácido lácticas</i>	18
<i>Lactobacillus casei</i>	19
<i>Streptococcus thermophilus</i>	20
<i>Sistema proteolítico</i>	22
Proteínas de la leche	25
<i>Caseínas</i>	26
<i>Proteínas del suero de leche</i>	27
Objetivos	28
Objetivo general	28
Objetivos específicos.....	28
Hipótesis	29
Material y métodos	29
Estrategia general	29
Aislamiento de bacterias	30
Fermentación.....	30
Cuenta de unidades formadoras de colonia.....	31
Tratamiento de muestras.....	31
Determinación de grupos amino libres (TNBS).....	31
Determinación de inhibición de la ACE	32
Determinación de la actividad antitrombótica.....	33
Purificación de péptidos (HPLC)	34
<i>Fraccionamiento de las muestras (exclusión molecular)</i>	34

<i>Purificación de fracciones (fase reversa, gradiente)</i>	35
<i>Confirmación de pureza (fase reversa, isocrático)</i>	35
Digestión con pepsina y tripsina.....	35
Identificación de péptidos.....	36
Análisis estadístico	36
Resultados y discusión	37
Fermentaciones con <i>Lactobacillus casei</i> Shirota y <i>Streptococcus thermophilus</i> con proteínas de suero de leche y caseínas.....	37
<i>Crecimiento y pH durante las fermentaciones</i>	37
<i>Proteólisis durante la fermentación</i>	38
Actividad antihipertensiva.....	39
<i>Inhibición de la ACE durante la fermentación</i>	39
<i>Inhibición de la ACE de las fracciones peptídicas</i>	40
<i>Purificación de los péptidos inhibidores de la ACE</i>	43
Actividad antitrombótica	45
<i>Actividad antitrombótica durante la fermentación</i>	45
<i>Actividad antitrombótica de las fracciones peptídicas</i>	46
<i>Purificación de los péptidos antitrombóticos</i>	48
Resistencia de los péptidos inhibidores de la ACE y antitrombóticos a la digestión gástrica simulada	49
Identificación por espectrometría (MALDI-TOF) de péptidos bioactivos.....	51
<i>Secuencia de los péptidos inhibidores de la ACE</i>	51
<i>Secuencia de los péptidos antitrombóticos</i>	52
<i>Péptidos bioactivos liberados de las proteínas de la pared celular de Lactobacillus casei</i> 53	
Conclusiones	54
Referencias	55
Anexos	62
Preparación de reactivos.....	62
<i>Medio de cultivo</i>	62
<i>Soluciones de la técnica de TNBS</i>	62
<i>Soluciones para la determinación de ACE</i>	63
<i>Soluciones para la determinación de la actividad antitrombótica</i>	64
<i>Soluciones para HPLC exclusión molecular</i>	64

<i>Soluciones para RP-HPLC</i>	64
<i>Soluciones para la digestión con pepsina y tripsina</i>	65
Curvas patrón	66
<i>Curva patrón de la técnica de TNBS</i>	66
<i>Curva patrón de concentración, HPLC (corazonina)</i>	66
<i>Curva patrón de masas molares HPLC (estándar de polipéptidos)</i>	67
Artículo publicado	68

Índice de figuras

Figura 1. Bioactividades de los péptidos derivados de las proteínas de la leche, y sistemas que estos pueden afectar (Korhonen, 2009).	4
Figura 2. Mecanismos de inhibición de la trombina (Schaden y Kozek-Langenecker, 2010).	12
Figura 3. Posibles mecanismos para la activación o inactivación de los péptidos bioactivos durante la digestión gastrointestinal, la absorción en el intestino y en la sangre (Vermeissen y col., 2004).	14
Figura 4. Mecanismos de transporte de péptidos en el intestino: (1) paracelular, (2) difusión pasiva, (3) endocitosis, (4) transporte mediado (Vermeissen y col., 2004).	16
Figura 5. Diferencias en la liberación de péptidos bioactivos con fermentación o digestión gástrica (Möller y col., 2008).	17
Figura 6. Micrografía electrónica de barrido de células de <i>Lactobacillus casei</i> (Gobbetti, 1999).	20
Figura 7 Micrografía electrónica de barrido de <i>Streptococcus thermophilus</i> CNRZ1066, por Lloyd G.Simonson, ASM Microbe Library from NCBI.	21
Figura 8. Sistema proteolítico de bacterias ácido lácticas (Savijoki y col., 2006).	22
Figura 9. Esquema general de la metodología llevada a cabo.	29
Figura 10. Evolución del crecimiento y pH durante las fermentaciones: <i>Lactobacillus casei</i> Shirota en proteínas de suero de leche (SLb) y caseína (CLb) y <i>Streptococcus thermophilus</i> en proteínas de suero de leche (SSSt) y caseína (CSt).	37
Figura 11. Grupos amino libres durante las fermentaciones: <i>Lactobacillus casei</i> Shirota en proteínas de suero de leche (SLb) y caseína (CLb) y <i>Streptococcus thermophilus</i> en proteínas de suero de leche (SSSt) y caseína (CSt).	38
Figura 12. Capacidad de inhibir de la ACE de las muestras tomadas durante las fermentaciones: <i>Lactobacillus casei</i> Shirota en proteínas de suero de leche (SLb) y caseína (CLb) y <i>Streptococcus thermophilus</i> en proteínas de suero de leche (SSSt) y caseína (SSSt).	39
Figura 13. Perfil cromatográfico de las muestras de fermentación con capacidad de inhibir la ACE fraccionadas por exclusión molecular (HPLC), las tres son del medio con proteínas del suero de leche: las dos primeras corresponden a la fermentación con <i>Lactobacillus</i>	

<i>casei</i> Shirota 15 (A) y 21 hr (B) y la última a <i>Streptococcus thermophilus</i> 42 hr (C). Las fracciones enmarcadas mostraron capacidad de inhibir la ACE.	42
Figura 14. Perfil cromatográfico obtenido por RP-HPLC de la fracción B4 de la fermentación con <i>Lactobacillus casei</i> Shirota en proteínas de suero de leche. Se seleccionaron los péptidos 10 y 12 que presentaron capacidad de inhibir la ACE se muestran enmarcados..	43
Figura 15. Actividad antitrombótica de las muestras tomadas durante las fermentaciones: <i>Lactobacillus casei</i> Shirota en proteínas de suero de leche (SLb) y caseína (CLb) y <i>Streptococcus thermophilus</i> en proteínas de suero de leche (SSt) y caseína (CSt).....	45
Figura 16. Perfil cromatográfico de las muestras de fermentación con actividad antitrombótica fraccionadas por exclusión molecular (HPLC). Las dos son de la fermentación con <i>Lactobacillus casei</i> Shirota en caseínas 27 hr (D) y 36 hr (E). Las fracciones enmarcadas mostraron actividad antitrombótica.	47
Figura 17. Perfil cromatográfico obtenido por RP-HPLC de la fracción E7 de la fermentación con <i>Lactobacillus casei</i> Shirota en caseínas. Los péptidos antitrombóticos que se seleccionaron 31, 32 y 33 se muestran enmarcados.	48
Figura 18. Curva patrón de glicina para la técnica de TNBS	66
Figura 19. Curva patrón de corazonina a 215 nm para HPLC.	66
Figura 20. Curva patrón de corazonina a 254 nm para HPLC.	66
Figura 21. Curva patrón de corazonina a 280 nm para HPLC.	67
Figura 22. Curva patrón para HPLC del estándar de polipéptidos.....	67

Índice de tablas

Tabla 1. Péptidos inhibidores de la ACE generados de proteínas de suero de leche.	9
Tabla 2. Enzimas proteolíticas purificadas y caracterizadas de <i>Lactobacillus casei</i> (Gobbetti, 1999).	23
Tabla 3. Pesos moleculares e inhibición de la ACE de las fracciones de suero de leche obtenidas por exclusión molecular.....	41
Tabla 4. Inhibición específica de la ACE de los péptidos obtenidos por RP-HPLC. De las muestras de fermentación con proteínas de suero de leche: <i>Lactobacillus casei</i> Shirota 15 hr (A), <i>Lactobacillus casei</i> Shirota 21hr (B) y <i>Streptococcus thermophilus</i> 42 hr (C).....	44
Tabla 5. Pesos moleculares y actividad antitrombótica obtenidas por exclusión molecular de las fracciones de la fermentación con <i>Lactobacillus casei</i> Shirota en caseínas.....	48
Tabla 6. Actividad antitrombótica de los péptidos obtenidos por RP-HPLC. De las muestras de fermentación con <i>Lactobacillus casei</i> Shirota en caseínas 27 hr (D) y 36 hr (E).	49
Tabla 7. Comportamiento de los péptidos sometidos a la digestión con enzimas gástricas.....	50
Tabla 8. Secuencia de aminoácidos de los péptidos bioactivos seleccionados.....	52
Tabla 9. Estándar de polipéptidos.	67

Introducción

Los péptidos bioactivos han sido ampliamente estudiados en las últimas décadas. Estos son fragmentos específicos de proteínas que tienen un impacto positivo en alguna función fisiológica, logrando finalmente mejorar la salud (Korhonen, 2009). Su estudio se ha concentrado en los péptidos generados a partir de proteínas de los alimentos, para su uso como nutracéuticos, en la industria de los alimentos funcionales. Los péptidos bioactivos pueden ser liberados de sus proteínas de origen por diferentes medios: *in vivo*, por las enzimas digestivas (ej. pepsina) o durante la hidrólisis por enzimas de microorganismos; e *in vitro*, durante el procesamiento de los alimentos por la acción de enzimas aisladas o por microorganismos (aprovechando su sistema proteolítico: ej. *Lactobacillus helveticus*) (Möller y col., 2008). Se han encontrado péptidos bioactivos en proteínas de semillas, peces, huevo, soya y productos lácteos, entre otros (Möller y col., 2008). De las diferentes fuentes estudiadas la más importante son las proteínas de la leche (Korhonen, 2009), de las cuales se han obtenido péptidos con distinta bioactividad: antihipertensivos, antioxidantes, antitrombóticos, hipocolesterolémicos, opioides (agonistas y antagonistas), acarreadores de minerales, anorexígenos, antimicrobianos, inmunomoduladores y citomoduladores; siendo los péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I, los más estudiados (Korhonen y Pihlanto, 2006).

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte, tanto en hombres como en mujeres en los países desarrollados; en el caso de los países en vías de desarrollo generalmente se encuentra entre las primeras cinco causas de muerte (Erdmann y col., 2008). La hipertensión y la trombosis son los mayores factores de riesgo para desarrollar un evento vascular cerebral (EVC), además la hipertensión causa cardiopatías y la trombosis puede causar afección grave en cualquier órgano. La Organización Mundial de la Salud estima que para el año 2020 las cardiopatías y EVC habrán rebasado a las enfermedades infecciosas y se convertirán en la causa número uno de muerte y discapacidad en el mundo (Erdmann y col., 2008).

En este trabajo se evaluó la capacidad de inhibir la ACE y la trombina en los péptidos liberados de suero de leche y caseína durante la fermentación con *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*. Los péptidos bioactivos se purificaron y se determinó su estabilidad frente a las enzimas gástricas pepsina y tripsina; se han reportado péptidos que tienen actividad *in vitro* no presentan actividad *in vivo*, esto puede deberse a que el

péptido fue hidrolizado por las enzimas digestivas, no fue absorbido en el intestino o se degradó por peptidasas presentes en el torrente sanguíneo (Vermeirssen y col. 2004). Muchos trabajos abordan parte de este problema sometiendo los péptidos encontrados a digestiones simulando el parte de lo que sucede en el tracto gastrointestinal, observando su resistencia a la digestión o la prevalencia de la bioactividad (Hernández-Ledesma y col., 2004; Quirós y col., 2005).

Debido al gran interés por alimentos funcionales y a los resultados positivos con diferentes especies de lactobacilos, en este trabajo se buscó obtener péptidos producidos durante la fermentación con *Lactobacillus casei* Shirota conocido ampliamente como probiótico y con *Streptococcus thermophilus* bacteria utilizada en la elaboración de varios productos lácteos; con el fin de esclarecer el origen de estos péptidos se realizaron fermentaciones con proteínas del suero de leche o caseínas; se determinó su capacidad de inhibir la ACE, bioactividad ampliamente estudiada, pero no reportada en péptidos producidos en dichas fermentaciones y la actividad antitrombótica de la cual existen pocos péptidos de origen lácteo.

Antecedentes

Péptidos bioactivos

La importancia de tener una buena alimentación como parte de una vida saludable ha cobrado gran relevancia en la actualidad. El valor de las proteínas como fuente esencial de aminoácidos está bien documentado, pero recientemente se ha reconocido que varios componentes de la dieta ejercen muchas otras funciones además de la función nutricional básica, es decir tienen alguna actividad biológica. La definición de sustancia bioactiva según Schrezenmeir y col. (2000) comprende a los componentes de los alimentos que pueden afectar los procesos biológicos y, por tanto, tener un impacto ¿benefico? en la función del cuerpo o en la salud en última instancia. Los componentes de la dieta ¿bioactivos o en general? pueden tener un impacto en los procesos biológicos si se consumen en grandes cantidades, esta definición es generalmente acotada por dos características (Möller y col., 2008): para ser considerado bioactivos, un componente de la dieta debe dar un efecto biológico medible a nivel fisiológico y la bioactividad medida tiene que presentar la posibilidad de afectar la salud de una manera beneficiosa, por lo tanto se excluyen de esta definición los efectos potencialmente dañinos (toxicidad, alergenicidad y la mutagenicidad).

Un ejemplo de esto son los péptidos bioactivos que se han definido como fragmentos de proteínas específicas que tienen un impacto positivo sobre la condición o funciones del cuerpo influyendo así en la salud (Kitts y Weiler, 2003); estos son inactivos dentro de la secuencia de las proteínas de los alimentos, pueden ser liberados por enzimas digestivas durante el tránsito gastrointestinal o de la fermentación o la maduración durante el procesamiento de alimentos. En la actualidad, las proteínas de la leche son consideradas la fuente más importante de péptidos bioactivos. La producción y las propiedades de los péptidos bioactivos generados a partir de las proteínas de la leche han sido revisados en numerosas publicaciones (Clare y Swaisgood, 2000; Pihlanto-Leppälä, 2001; Pihlanto y Korhonen, 2003; Silva y Malcata, 2005; Korhonen y Pihlanto, 2006; Hartman y Meisel, 2007; Dziuba y Darewicz, 2007; Möller y col. 2008; Korhonen, 2009). Al consumir los péptidos bioactivos estos pueden afectar los sistemas principales del cuerpo; se sabe de péptidos que afectan los sistemas cardiovascular, digestivo, endocrino, inmunológico y nervioso. Por esta razón, el conocer las secuencias de dichos péptidos, que pueden promover la salud reduciendo los riesgos de enfermedades crónicas o mejorar el sistema inmune al ser consumidos en la dieta, a despertado un creciente interés científico y comercial en la última década (Hartmann y Meisel, 2007). Existen diversos péptidos de secuencias conocidas que presentan actividad antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica, antihipertensiva, inmunomoduladora y opiácea, asimismo se conocen algunos péptidos con secuencias multifuncionales (Clare y Swaisgood, 2000; Meisel, 2004). La actividad de estos péptidos se basa en su composición y secuencia de aminoácidos. El tamaño de las secuencias de péptidos bioactivos puede variar de 2 a 20 aproximadamente. La figura 1 muestra los beneficios potenciales para la salud de los péptidos bioactivos que se han reportado.

Funciones de los péptidos bioactivos

Se han descrito diversas bioactividades presentadas por péptidos al ser liberados de las proteínas de los alimentos. Una vez activados, estos péptidos, son moduladores potenciales de muchos procesos de regulación en los sistemas vivos. Las estructuras primarias y secundarias de las principales proteínas de la leche humana y bovina están bien caracterizados y la bioactividad potencial de los péptidos liberados de estas proteínas están siendo investigados ampliamente (Korhonen, 2009). Estas funciones se relacionan con una mejora de las condiciones de salud general o de una reducción del riesgo de ciertas enfermedades crónicas e incluyen a los péptidos opiáceos (con actividad análoga a los opioides), osteo-protectores, antimicrobianos, anticaries, antitrombóticos, contractotes del

íleon¹, antihipertensivos, anticolesterolémicos, inmunomoduladores, antioxidantes, y con propiedades promotoras del crecimiento (Möller y col., 2008). Péptidos específicos pueden tener uno o más efectos biológicos diferentes (Meisel, 2004). A continuación se describen algunos de estos casos según el sistema en el que intervienen en el cuerpo humano (figura 1).

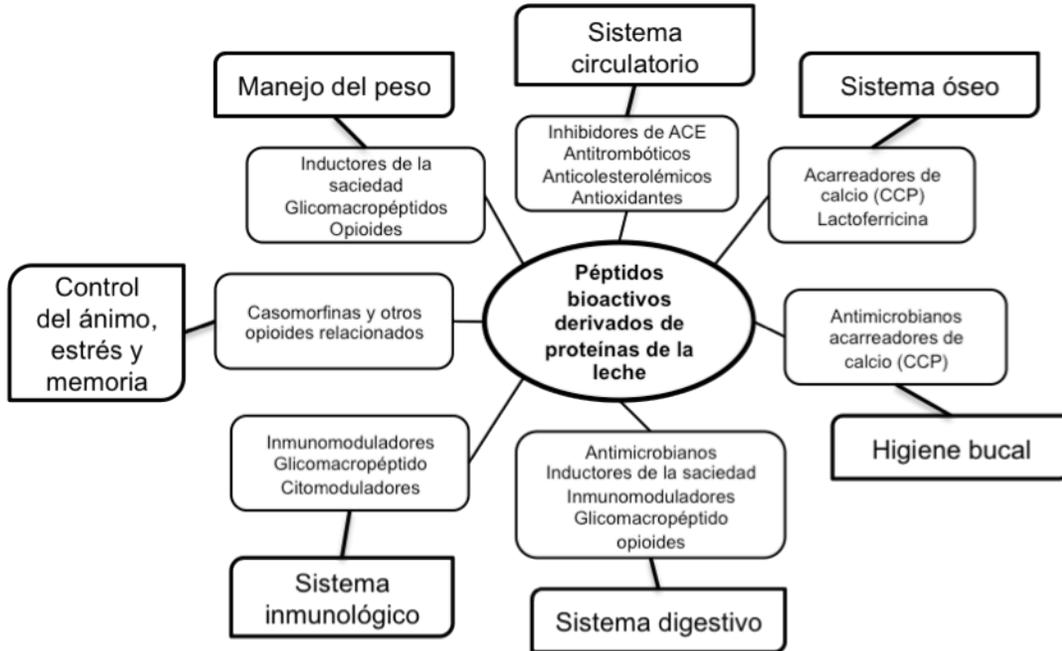


Figura 1. Bioactividades de los péptidos derivados de las proteínas de la leche, y sistemas que estos pueden afectar (Korhonen, 2009).

Sistema digestivo (absorción de nutrientes y péptidos antimicrobianos)

Los péptidos derivados de las proteínas de los alimentos pueden desempeñar funciones importantes en el tracto intestinal antes de su hidrólisis y su posterior absorción. Esto incluye la regulación de las enzimas digestivas y la modulación de la absorción de nutrientes en el tracto intestinal (Shimizu, 2004). En este último caso, el papel de los péptidos bioactivos se ha estudiado sobre todo en la segunda mitad del siglo XX. La primera referencia a los péptidos bioactivos en la literatura científica fue hecha por Mellander en 1950, quien sugirió que los péptidos fosforilados derivados de la caseína, caseinofosfopéptidos (CPP), aumentan la **calcificación de los huesos** independiente de vitamina D (Korhonen y Pihlanto, 2006). Las caseínas bovinas α_{s1} , α_{s2} y β contienen regiones fosforiladas que pueden ser liberadas por las enzimas digestivas. Los CPP pueden formar sales solubles

¹ Íleon: Tercera porción del intestino delgado de los mamíferos, que empieza donde acaba el yeyuno y termina en el ciego.

organofosfatadas y esto puede llevar a una mayor absorción de calcio y a una disminución de la precipitación de calcio en el íleon. El efecto **anticaries** de los CPP ha sido bien documentado en estudios con humanos y en modelos animales (Meisel, 2001). Los CPP pueden tener un efecto anticariogénico mediante la promoción de la recalcificación del esmalte dental, mientras que el glicomacropéptido (GMP) derivado de la κ -caseína parece contribuir al efecto anticaries al inhibir la adherencia y crecimiento de las bacterias que forman la placa en la mucosa oral (Bouhallab y Bouglé, 2004; Aimitus, 2004).

Los péptidos **antimicrobianos** han sido identificados a partir de hidrolizados de proteínas de la leche (Clare, y col., 2003; Gobbetti y col. 2004;). Los más estudiados son las lactoferrinas, derivados de la lactoferrina bovina y humana, y otros que se han identificado a partir de las α_{s1} -caseína y α_{s2} -caseína. Estos péptidos presentan actividad antimicrobiana frente a diversas bacterias Gram-positivas y negativas, por ejemplo, *Escherichia*, *Helicobacter*, *Listeria*, *Salmonella* y *Staphylococcus*, levaduras y hongos filamentosos. La pérdida de la permeabilidad normal de la membrana celular es parcialmente responsable de los mecanismos antibacteriales de las lactoferrinas, también puede inhibir su crecimiento compitiendo por iones Fe.

Sistema nervioso

Péptidos con actividad opioide han sido identificados en las fracciones de caseína hidrolizada por varias enzimas digestivas (Pihlanto-Leppala, 2001; Teschemacher, 2003). Estos péptidos son ligandos de los receptores de opioides que pueden presentar actividad como **opioides agonistas o antagonistas**. Los receptores opioides se encuentran en el sistema nervioso, el endocrino y el inmunológico, así como en el tracto gastrointestinal de los mamíferos y pueden interactuar con ligandos endógenos y con ligandos opioides u opioides antagonistas exógenos (estos contrarrestan los efectos de los opiodes compitiendo por sus receptores; dependiendo el receptor sobre el que actúen pueden presentar actividad como analgésicos, depresores del sistema nervioso central, antiespasmódicos y euforizantes. Por lo tanto, los péptidos opioides administrados por vía oral pueden modular los procesos de absorción en el intestino y la influencia de la función gastrointestinal de dos maneras: primero, al afectar los músculos lisos, lo que reduce el tiempo de tránsito, y en segundo lugar, al afectar el transporte intestinal de electrolitos, lo que explica sus propiedades antidiarreicas.

Sistema cardiovascular

Son varios los péptidos bioactivos que pueden afectar el sistema cardiovascular, entre estos se encuentran los péptidos antihipertensivos y antitrombóticos, objeto de estudio de esta tesis, de los cuales se hablará más ampliamente en la siguiente sección.

Nagaoka y col. (2001) identificaron el péptido hipocolesterolémico IIAEK², a partir del hidrolizado triptico de la β -lactoglobulina. Este péptido suprime la absorción del colesterol por las células Caco-2 *in vitro* y presentó la actividad hipocolesterolemia *in vivo* en ratas tras la administración oral del péptido en solución; todavía no se conoce el mecanismo del efecto hipocolesterolémico.

Los péptidos **antioxidantes** pueden ser liberados de las caseínas durante la hidrólisis por enzimas digestivas y en la fermentación de la leche con bacterias ácido lácticas (Pihlanto, 2006). La mayoría de los péptidos identificados se derivan de las α_s -caseínas y se ha demostrado que poseen la capacidad de captar radicales libres e inhibir la peroxidación enzimática y no enzimática de lípidos (Knipping y col. 1990; Kitts, 2005).

Sistema inmunológico

Los hidrolizados de proteínas de la leche y los péptidos derivados de la caseína y las proteínas de suero de leche pueden aumentar las principales funciones de las células inmunitarias, como la proliferación de linfocitos, la síntesis de anticuerpos y la regulación de las citoquinas (Gill y col., 2000); esto se ha observado en los péptidos liberados durante la fermentación de leche con bacterias ácido lácticas (Matar y col., 2003; Meisel y FitzGerald, 2003). Se ha sugerido también que los péptidos inmunomoduladores derivados de las proteínas de la leche pueden aliviar las reacciones alérgicas en seres humanos y mejorar la inmunidad de la mucosa en el tracto gastrointestinal (Korhonen y Pihlanto, 2006). Los péptidos inmunomoduladores pueden regular el desarrollo del sistema inmunológico en los recién nacidos. Se ha sugerido también que péptidos inmunomoduladores liberados durante la fermentación de leche pueden contribuir a los efectos antitumorales (Matar y col., 2003).

Péptidos multifuncionales

Muchos péptidos derivados de las proteínas de la leche tienen más de un papel funcional, por ejemplo, los péptidos del fragmento 60-70 de la β -caseína presentan actividad

² Código de aminoácidos de una letra

inmunoestimulante, opioide e inhibitoria de la ACE. Esta secuencia ha sido definida como una zona estratégica (Meisel, 1998). La secuencia resiste la proteólisis debido a su alta hidrofobicidad y la presencia de residuos de prolina. Otros ejemplos de la multifuncionalidad de los péptidos derivados de la leche incluyen la fracción 194-199 de α_{s1} -caseína, que presentan actividad inmunomoduladora e inhibitoria de la ACE; los péptidos opioides α y β lactofina también exhiben capacidad de inhibir la ACE, y algunos CPP poseen propiedades inmunomoduladoras (Korhonen y Pihlanto, 2006).

Actividad antihipertensiva

Hipertensión

La hipertensión es un aumento sostenido de la presión arterial y se asocia con mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares. La hipertensión afecta a 65 millones de adultos y es un factor de riesgo para infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, insuficiencia cardiaca e insuficiencia renal. El control de la presión arterial es crucial en la prevención de estos posibles resultados adversos. Sin embargo, la hipertensión puede ser asintomática, por lo que muchas personas con hipertensión no visitan a un médico. La detección y control de la presión arterial es, por tanto, un importante problema de salud pública en los países desarrollados y cada vez más en los países en desarrollo lo que hace muy importante la cultura de la prevención (Ong y col., 2007). El tratamiento se basa en la identificación y la revisión de los factores del estilo de vida que contribuyen a la hipertensión; diagnóstico y tratamiento adecuado de las causas de la hipertensión, y el uso eficaz de los medicamentos. Son recomendados cambios en el estilo de vida, incluyendo pérdida de peso, ejercicio regular, la ingestión de un alto contenido de fibra, dieta baja en grasas y sal, así como la reducción en el consumo de alcohol (Calhoun y col., 2008). El tratamiento específico con fármacos antihipertensivos está indicado si las modificaciones en el estilo de vida no reducen la presión sanguínea a valores normales. Los diuréticos y los beta bloqueadores reducen la incidencia de eventos adversos relacionados con las enfermedades cerebrovasculares. En la mayoría de los casos, se utilizan dosis bajas de diuréticos como terapia antihipertensiva inicial. Los bloqueadores de canales de calcio de acción prolongada pueden ser usados como terapia alternativa en pacientes con hipertensión sistólica aislada. También pueden administrarse inhibidores de la ACE y antagonistas del receptor de la angiotensina II, en pacientes con hipertensión leve (Chobanian y col., 2003).

Los péptidos bioactivos inhibidores de la ACE liberados de proteínas de los alimentos pueden causar efectos antihipertensivos. Existen varias investigaciones que han demostrado el efecto antihipertensivo de los péptidos inhibidores de la ACE o de los alimentos que contienen estos compuestos bioactivos, en pacientes hipertensos, (Seppo y col. 2003; Erdman y col., 2008; Saito, 2008). Además, varios estudios realizados en ratas espontáneamente hipertensas sugieren una supresión significativa del desarrollo de la hipertensión con una dieta rica en péptidos inhibidores de la ACE (Sipola y col., 2002). Los péptidos inhibidores de la ACE, como parte de un producto alimenticio o como nutracéuticos, podrían ser de interés en el tratamiento y la prevención de la hipertensión (como un adyuvante del tratamiento farmacológico). En comparación con los fármacos inhibidores de la ACE, los péptidos derivados de proteínas de alimentos tienen ciertas ventajas; los péptidos inhibidores de la ACE tienen una menor actividad inhibidora de la ACE *in vitro* que los fármacos, pero no tienen los efectos secundarios dañinos, como hipotensión, tos, aumento de los niveles de potasio, disminución de la función renal, angioedema, que se asocian a las drogas producidas sintéticamente (Fitzgerald y Meisel, 2000). También representan un costo mucho menor en la atención médica; como parte de la dieta diaria, son muy seguros para el consumidor. Los péptidos inhibidores de la ACE derivados de los alimentos se ajustan bien al concepto de nutrición que puntualiza la relación entre la nutrición y la salud humana. Los fármacos inhibidores de la ACE tienen una gran utilidad, sin embargo no es la intención reemplazar los fármacos, los péptidos inhibidores de la ACE podrían ser aplicados en algunos casos, especialmente en la prevención de la hipertensión y como tratamiento inicial en personas moderadamente hipertensas, mientras que en otros casos podrían funcionar como un tratamiento adicional (Vermeirssen y col. 2004).

Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina ACE

La ACE (peptidildipeptidasa hidrolasa), es una exopeptidasa que escinde dipéptidos del extremo C-terminal de diferentes péptidos. Como parte del sistema renina-angiotensina, la ACE hidroliza la angiotensina I, un decapeptido inactivo para resultar en la angiotensina II, que es un potente vasoconstrictor. La ACE también forma parte del sistema quinina-callicreína, en el cual se hidroliza la bradiquinina, que tiene una acción vasodilatadora; aumentando así el efecto hipertensor de la actividad de esta enzima. La ACE se encuentra ampliamente distribuida en muchos tejidos; en algunos casos, incluso cuando los demás componentes del sistema renina-angiotensina o quinina-callicreína no están presentes; esto refuerza la idea de que la ACE tiene probablemente otras funciones además de la

producción de angiotensina II y la inactivación de la bradiquinina (López-Fandiño y col., 2006). Los inhibidores de la ACE se descubrieron por primera vez en el veneno de serpiente. Desde entonces, los inhibidores sintéticos de la ACE como captopril, enalapril, lisinopril y alecepril se utilizan ampliamente en el tratamiento de la hipertensión a pesar de sus efectos secundarios (FitzGerald y col., 2004).

Tabla 1. Péptidos inhibidores de la ACE generados de proteínas de suero de leche.

Proteína fuente	Proceso de obtención	Estructura	Inhibición específica ^a	Referencia
α-lactoalbúmina	termolisina	VSLPEW	0.12	Otte y col., 2007
		GVSPLEW	2.11	
		YGGVSLPEW	3.10	
		LKGYGGVSLW	0.46	
	tripsina	WLAHK	0.99	Pihlanto-Leppälä y col., 2000
		VGINYWLAHK	0.13	
pepsina	YGLF	0.12	Mullally y col., 1997	
β-lactoglobulina	<i>Lb. brevis</i>	AEKTK	0.10	Ahn y col., 2009
	<i>Lb. helveticus</i>	AQSAP	0.21	
		IPAVF	9.40	
	tripsina	VFK	0.12	Pihlanto-Leppälä y col., 2000
		LAMA	0.12	
		LDAQSAPLR	0.08	
	proteínasa K	IPA	1.06	Abubakar y col., 1998
seroalbúmina	tripsina	ALKAWSVAR	0.07	FitzGerald y col., 2004
	proteínasa K	FP	0.57	Abubakar y col., 1998

^aInhibición específica: % inhibición /($\mu\text{g mL}^{-1}$)

La búsqueda de la actividad inhibidora de la ACE es la estrategia más común para la selección de hidrolizados y/o péptidos derivados de proteínas de los alimentos con actividad antihipertensiva. La metodología generalmente usada incluye la determinación *in vitro* de la actividad inhibidora de la ACE de hidrolizados de proteínas, obtenidos por digestión enzimática o fermentación microbiana, seguido de la purificación e identificación de las secuencias de los péptidos. Existen varios trabajos que presentan una revisión de las secuencias de péptidos de la leche reportados con capacidad de inhibir la ACE (Korhonen, 2009; Korhonen y Pihlanto 2006; Saito 2008; Erdman y col., 2008; Hong y col., 2008; FitzGerald y col., 2004; FitzGerald y Meisel, 2000); en la tabla 1 se pueden observar algunos ejemplos de péptidos inhibidores de la ACE de proteínas de suero de leche obtenidos por diferentes mecanismos.

La relación estructura-actividad de los péptidos inhibidores de la ACE obtenidos a partir de proteínas de los alimentos, no ha sido bien establecida aún; sin embargo, se han encontrado

algunas características generales (Fitzgerald y col., 2004; Meisel, 1997). Los inhibidores de la ACE por lo general contienen péptidos de 2 a 12 aminoácidos, aunque han sido identificados péptidos activos con un máximo de 27 aminoácidos (Robert y col., 2004; Saito y col., 2000; Yamamoto y col., 1994). La secuencia C-terminal de los péptidos es muy importante para la unión a la ACE; los péptidos son más activos si están presentes aminoácidos hidrofóbicos (por ejemplo, la prolina) en las últimas tres posiciones del extremo C-terminal. La presencia de la carga positiva de la lisina y arginina en el residuo C-terminal puede contribuir a la potencia inhibitoria. Pripp y Col. (2004) establecieron la relación estructura-actividad cuantitativa para los péptidos inhibidores de la ACE derivados de proteínas de la leche. Para los péptidos de hasta seis aminoácidos, se encontró una relación entre la actividad inhibidora de la ACE y algunas de las características del péptido (hidrofobicidad y un aminoácido cargado positivamente en la posición C-terminal). No se encontró relación entre la estructura N-terminal y la actividad inhibidora de la ACE. El hecho de que los sitios catalíticos de la ACE tienen diferentes requisitos de conformación puede indicar que hay una necesidad para el desarrollo de una compleja mezcla de péptidos, con características de conformación ligeramente diferente, con el fin de inhibir la actividad de la ACE de forma más completa (Gobbetti y col., 2002). Además, se ha postulado que el mecanismo de inhibición de la ACE puede implicar la interacción del inhibidor con subsitios que no se ocupan por los sustratos o con un inhibidor de sitio aniónico de unión que es diferente al del sitio catalítico de la enzima (Meisel, 1997). Los péptidos pueden adoptar diferentes configuraciones dependiendo de las condiciones ambientales, que determinan su actividad biológica, por ejemplo, la bradiquinina, como una estructura espiral o extendida al azar, es abierta y sensible a la ruptura de la ACE. A su vez, una vuelta β en el extremo C-terminal de la bradiquinina en agua sólo da una interacción débil con la ACE (López-Fandiño y col., 2006).

Actividad antitrombótica

Trombosis

La hemostasia es el mecanismo en los vertebrados para limitar la pérdida de sangre de los vasos sanguíneos dañados a través de la formación de un coágulo, mientras que mantiene la sangre en estado líquido, donde la circulación se mantiene (Mellanby, 1909). Este sistema es necesario para mantener la integridad del sistema circulatorio, y las perturbaciones en el equilibrio entre los agentes procoagulantes y anticoagulantes que puede provocar una hemorragia o trombosis. La formación de la enzima clave para la coagulación, la trombina,

se da a través de una serie de reacciones estrictamente reguladas que involucran a un grupo de proteasas plasmáticas y cofactores. Entre las muchas funciones de la trombina está la escisión del fibrinógeno para formar fibrina y la activación de las plaquetas; los dos son los componentes principales de los coágulos sanguíneos, normales y patológicos (Lane y col., 2005). A pesar de que los procesos que conducen a la obstrucción de un vaso sanguíneo por un trombo sean bastante complejos, en muchas situaciones, el aumento en la generación de la trombina puede atribuirse al incremento de los estímulos procoagulantes o a la disminución de los mecanismos regulatorios (Gailani y Renné, 2007).

La propuesta de que la trombosis es la hemostasia en el lugar equivocado, (Macfarlane, 1948) implica que los procesos principales que conducen a la generación de trombina durante la coagulación patológica, son similares a los que participan en la hemostasia; es posible que la única diferencia entre éstas sea la intensidad o la ubicación. Es por esto que la mayoría de los anticoagulantes tienen como objetivo a la trombina o proteinasas plasmáticas, como el factor Xa, que se requiere para la generación de la trombina. Aunque eficaz para reducir el crecimiento del trombo, estas terapias, también implican un riesgo significativo de hemorragia (Gailani y Renné, 2007), por lo que la búsqueda de nuevos anticoagulantes no ha cesado.

Inhibición de la trombina

La trombina es una serina proteasa dimérica, que como ya se ha mencionado, juega un papel importante en la formación del trombo; los primeros inhibidores de esta enzima se encontraron en sanguijuelas. Uno de los agentes activos en la saliva de las sanguijuelas es la hirudina, el prototipo de un inhibidor directo de la trombina irreversible bivalente. El efecto de la inhibición de la trombina por la hirudina fue encontrado en 1955, y la estructura química de la hirudina (polipéptido) se conoce desde 1976. En consecuencia, fueron desarrollados hirudinas recombinantes (lepirudina y desirudina) con fines médicos. Aunque son efectivos, la tasa de aumento de la hemorragia es una complicación grave de estos inhibidores directos de la trombina de primera generación (Gailani y Renné, 2007).

Los mecanismos de inhibición de la trombina son variados. La trombina ofrece tres sitios de unión (figura 2). Los inhibidores directos se unen a la trombina y bloquean su interacción con sus muchos y variados sustratos. Los inhibidores directos bivalentes como la lepirudina y la bivalirudina inhiben tanto el sitio catalítico, como una zona externa. Los inhibidores univalentes directos como el argatrobán y el dabigatrán inhiben sólo el sitio catalítico. Los

inhibidores directos bloquean a la trombina libre o unida a la fibrina, de forma igual. Los inhibidores indirectos solo bloquean los exositios (Schaden y Kozek-Langenecker, 2010).

La mayoría de los inhibidores de la trombina en la naturaleza son componentes de la saliva de hematófagos como sanguijuelas y garrapatas (Schaffer y col., 1991; Ciprandi y col., 2006). En la actualidad no se conoce un péptido bioactivo derivado de las proteínas de los alimentos que inhiba la trombina.

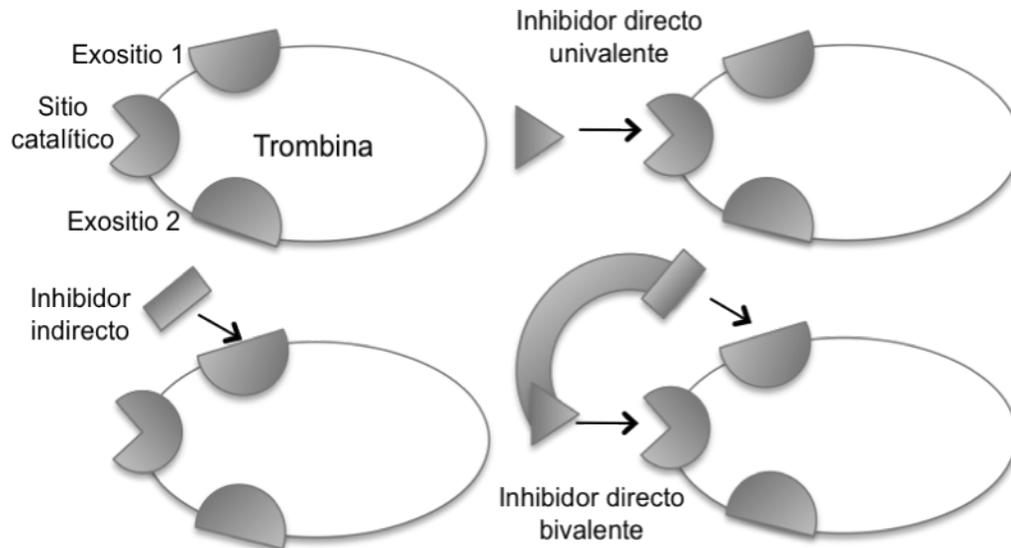


Figura 2. Mecanismos de inhibición de la trombina (Schaden y Kozek-Langenecker, 2010).

Péptidos inhibidores de la formación del trombo

Se ha demostrado que existe una gran cantidad de similitudes moleculares entre los mecanismos implicados en la coagulación de la leche, que se inicia con la hidrólisis de la κ -caseína por la quimosina, y la coagulación sanguínea, que se debe a la interacción de fibrinógeno con la trombina (Erdman y col., 2008). Hasta la fecha, los péptidos con propiedades antitrombóticas son principalmente el resultado de la hidrólisis enzimática de la κ -caseína de origen bovino.

El principal péptido antitrombótico es MAIPPKKNQDK, péptido aislado del fragmento soluble del extremo C-terminal de la κ -caseína, que corresponde a los residuos 106-116 y se le llama casoplatelina. Este undecapéptido inhibe la agregación de las plaquetas activadas, así como la unión de la cadena γ del fibrinógeno humano a la región receptora en la superficie plaquetaria. Los fragmentos más pequeños de este péptido, conocidos como casoplatelinas, también pueden afectar la función plaquetaria a pesar de que tienen una actividad inhibitoria

mucho más baja que el fragmento completo (Jollès y col., 1986). Tres residuos de aminoácidos (isoleucina 108, lisina 112, aspartato 115) del undecapéptido mencionado parecen ser importantes para el efecto antitrombótico, ya que son homólogos en las posiciones de la cadena γ del fibrinógeno humano. Por lo tanto, la actividad antitrombótica se ve influenciada por la competencia de los receptores plaquetarios entre la casoplatelina y la cadena γ del fibrinógeno humano (Fiat y col., 1989).

Por otra parte, el péptido derivado de lactoferrina humana, KRDS, que tiene similitudes estructurales con la cadena α del fibrinógeno, ha demostrado inhibir la agregación plaquetaria, pero en menor medida que el péptido análogo del fibrinógeno, RGDS (Raha y col., 1988). Es probable que KRDS y RGDS tengan diferentes mecanismos de acción y/o sus sitios de unión son diferentes. Se ha demostrado la actividad antitrombótica *in vivo* para el undecapéptido casoplatelina, así como para el tetrapéptido derivado de la lactoferrina; además, ningún efecto tóxico ha sido reportado (Erdman y col., 2008). Por el contrario, se ha encontrado que la secuencia RGDS puede inducir la separación de las células endoteliales *in vitro* y por lo tanto, existen serias preocupaciones sobre la toxicidad de esta secuencia *in vivo*. El péptido KRDS no parece tener los mismos efectos perjudiciales potenciales que el RGDS posiblemente debido a su diferente modo de acción (Rutherford y Gill, 2000).

Biodisponibilidad de péptidos bioactivos

En la mayoría de los casos, los efectos de los péptidos bioactivos se prueban *in vitro*: Para los péptidos antihipertensivos, la capacidad de inhibir la ACE se analiza comúnmente *in vitro*, por medio de sustratos sintéticos como tripéptidos y dipéptidos, con un grupo amino sustituido, como el hipuril-histidil-leucina (Cushman y Cheung, 1971), el 2-furanocril-fenilalanil-glicil-glicina (Vermeirssen y col., 2002) y a través de radioisótopos, con métodos espectrofotométricos, fluorométricos y cromatográficos. Para los péptidos antitrombóticos existen diversas pruebas *in vitro*, según la forma de inhibir el trombo, aunque en su mayoría los fármacos de este tipo se prueban en modelos animales. La actividad *in vitro* de un péptido es solo indicadora de una posible respuesta biológica, sin embargo, para la demostración de un efecto *in vivo* se requiere un efecto medible en una condición fisiológica determinada. Los efectos antihipertensivos se pueden medir en ratas espontáneamente hipertensas, que están genéticamente predispuestas a tener una presión arterial alta (Fuglsang y col. 2002) y en ensayos clínicos con pacientes hipertensos. La relación estructura-actividad de los péptidos puede ayudar a reconocer péptidos con actividad *in vivo*.

Sin embargo, es difícil establecer una relación directa entre la capacidad de inhibir la ACE *in vitro* y la actividad antihipertensiva *in vivo*. La biodisponibilidad tras la administración oral juega un papel importante para ejercer efecto fisiológico *in vivo* después de la ingestión oral; es muy importante que los péptidos se mantengan activos durante la digestión y la absorción gastrointestinal, para que por último alcancen el sistema sobre el que se desea que actúen. Los péptidos inhibidores de la ACE pueden ser liberados y también degradados en el cuerpo humano. En la figura 3 se observan los posibles obstáculos en el cuerpo humano, donde los péptidos bioactivos pueden ser inactivados.

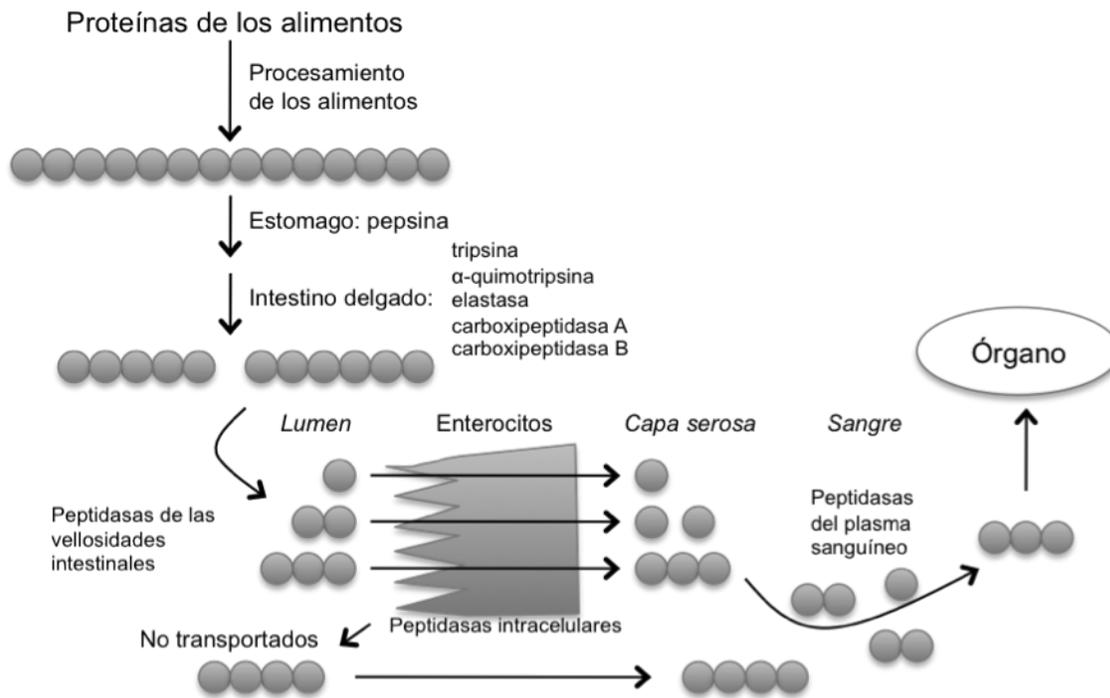


Figura 3. Posibles mecanismos para la activación o inactivación de los péptidos bioactivos durante la digestión gastrointestinal, la absorción en el intestino y en la sangre (Vermeissen y col., 2004).

La digestión gastrointestinal

La digestión de las proteínas comienza en el estómago por la acción de la pepsina a pH ácido. En la fase luminal del intestino delgado, los polipéptidos son hidrolizados por proteasas del páncreas: tripsina, quimotripsina, elastasa y carboxipeptidasa A y B en un pH alcalino. Esto resulta en una mezcla de péptidos y aminoácidos libres, de los cuales los péptidos constituyen una parte importante. Los aminoácidos libres son absorbidos en los enterocitos a través de las vellosidades de la membrana intestinal por medio de distintos sistemas de transporte de aminoácidos. Los péptidos son sometidos a una hidrólisis más por la acción de las peptidasas de las vellosidades del intestino, lo que resulta en una mezcla

que consiste mayormente de aminoácidos libres, dipéptidos y tripéptidos. Las vellosidades de la membrana del intestino es particularmente rica en aminopeptidasas, que se complementan con las carboxipeptidasas presentes en el jugo pancreático; además de estas enzimas, también contiene endopeptidasas y dipeptidasas. Los péptidos con prolina e hidroxiprolina generalmente son resistentes a la degradación por las enzimas digestivas. Además, los tripéptidos que contienen en el C-terminal prolina-prolina son reportados como resistentes a peptidasas específicas de prolina (FitzGerald y Meisel, 2000). Esto subraya el hecho de que varios péptidos bioactivos que se ha demostrado ejercen un efecto *in vivo*, se han aislado de la caseína y de la gelatina, ya que estas proteínas tienen un alto contenido de prolina.

Absorción en el intestino

Los dipéptidos y tripéptidos son absorbidos intactos a través de las vellosidades de la membrana del intestino por un sistema de transporte de péptidos específicos. El sistema de transporte PepT1 usa un gradiente electroquímico de protones transmembranal como fuerza impulsora y tiene una amplia especificidad de sustrato (Yang y col., 1999). El transporte de los péptidos pequeños se ve favorecido por lo que son absorbidos más rápidamente que los aminoácidos libres. Una vez dentro del enterocito, estos péptidos son hidrolizados en el citoplasma por diversas peptidasas intracelulares: aminotripeptidasas, que liberan el aminoácido del extremo N-terminal de tripéptidos, y varias dipeptidasas con diferentes especificidades de sustrato por aminoácidos específicos. Las iminodipeptidasas o prolidasas son de mucho interés por su especificidad restringida por dipéptidos del tipo X-prolina o X-hidroxiprolina. Los aminoácidos atraviesan la membrana vasolateral y entran en el torrente sanguíneo a través de sistemas específicos de transporte de aminoácidos (Ganapathy y Leibach, 1999).

El transporte de péptidos y proteínas intactas del lumen intestinal a la circulación de la sangre es un fenómeno único, diferente del proceso normal de digestión y absorción de alimentos. Aparte de la ruta de transporte de péptidos, los péptidos pueden ser absorbidos intactos a través de la mucosa intestinal mediante otros mecanismos (figura 4). De forma *paracelular*, los péptidos solubles en agua pasan a través del espacio entre las células. Los péptidos liposolubles parecen ser capaces de difundirse de forma *transcelular* (difusión pasiva). Los péptidos también pueden entrar en los enterocitos a través de *endocitosis*, lo que implica que la membrana forme una vesícula alrededor del material. La membrana vasolateral intestinal también posee un transportador de péptidos, lo que facilita la salida de

péptidos pequeños resistentes a la hidrólisis del enterocito a la circulación sanguínea (*transporte mediado*) (Vermeissen y col., 2004).

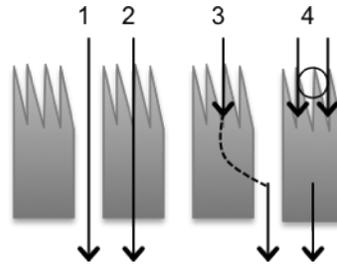


Figura 4. Mecanismos de transporte de péptidos en el intestino: (1) paracelular, (2) difusión pasiva, (3) endocitosis, (4) transporte mediado (Vermeissen y col., 2004).

Estabilidad en el torrente sanguíneo

La sangre contiene peptidasas, por lo que la vida media de ciertos péptidos en el plasma es muy corta, con un orden de magnitud de un minuto. Los péptidos con capacidad de inhibir la ACE *in vitro* deben resistir la acción hidrolítica de la misma ACE para ejercer un efecto antihipertensivo *in vivo*. De esta forma los péptidos inhibidores de la ACE se pueden clasificar en tres grupos: el tipo inhibidor, de los cuales los valores de inhibición específica no se ve afectada por la preincubación con ACE; el tipo sustrato, los péptidos que son hidrolizados por la ACE para dar péptidos con una actividad más débil; el tipo inhibidor pro-fármaco, los péptidos que se convierten en verdaderos inhibidores por medio de la acción de la ACE o de otras proteasas gastrointestinales. Los péptidos que pertenecen a los tipos inhibidor o inhibidor pro-fármaco son capaces de ejercer actividad antihipertensiva tras su administración oral (Vermeissen y col., 2004).

Producción de péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos se encuentran dentro de la secuencia de aminoácidos de las proteínas de los alimentos y son liberados después de la degradación de éstas.

Los péptidos bioactivos pueden ser producidos de las siguientes maneras:

- a) hidrólisis enzimática por medio de enzimas digestivas,
- b) fermentación con bacterias proteolíticas,
- c) proteólisis por enzimas derivadas de microorganismos o plantas.

En muchos estudios, se han combinado los métodos anteriores y esto ha demostrado ser eficaz en la generación de péptidos funcionales.

Los péptidos bioactivos pueden ser liberados de las proteínas de los alimentos después del consumo de éstos, a lo largo de todo el intestino, y pueden mostrar actividad biológica en el intestino delgado y grueso. Sin embargo, dado que la mayoría de proteínas de los alimentos se degradan durante su tránsito por el intestino delgado y la actividad microbiana se produce predominantemente en el intestino grueso, la liberación de los péptidos por enzimas microbianas durante la digestión se da solo en este sitio del intestino. La plasmina de la leche o las proteasas de las bacterias ácido lácticas usadas para fermentar la leche también pueden degradar las proteínas (Möller y col., 2008). En comparación con las enzimas digestivas, las enzimas microbianas, ya sea en el intestino o en el procesamiento de los alimentos, presentan diferentes sitios de corte. Por lo que, los péptidos liberados por estas enzimas pueden diferir de los liberados por las enzimas digestivas. También pueden ser precursores de péptidos liberados en el tracto intestinal (figura 5).

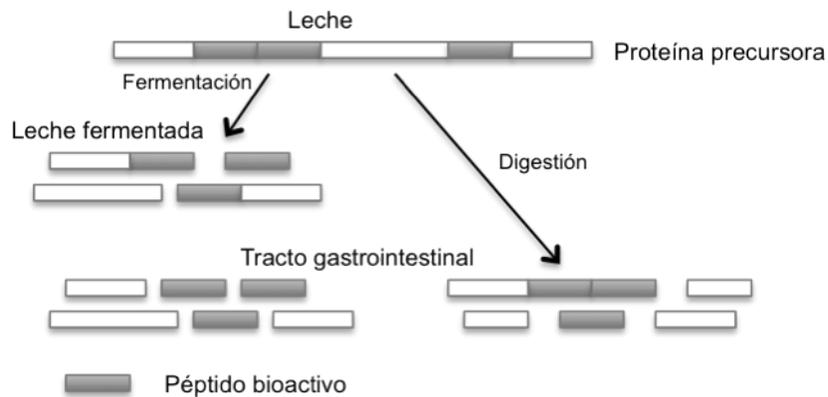


Figura 5. Diferencias en la liberación de péptidos bioactivos con fermentación o digestión gástrica (Möller y col., 2008).

Hidrólisis enzimática

La manera más común para producir péptidos bioactivos es a través de la hidrólisis enzimática de las moléculas de proteína completa. Un gran número de estudios han demostrado que la hidrólisis de las proteínas de la leche por las enzimas digestivas puede producir péptidos biológicamente activos (Korhonen y Pihlanto, 2006). Las enzimas más importantes son la pepsina, la tripsina y la quimotripsina que han demostrado que liberan una serie de péptidos antihipertensivos, CPP, antibacterianos, inmunomoduladores y péptidos opioides, originados de diferentes proteínas, α , β y κ -caseína así como las proteínas de suero de leche, α -lactalbúmina, β -lactoglobulina y glicomacropéptido (GMP) (Meisel y

FitzGerald, 2003; Yamamoto y col., 2003; Fitzgerald y col., 2004). Los péptidos que inhiben la ACE son los más estudiados (Murray y FitzGerald, 2007; Saito, 2008). En algunos estudios, los hidrolizados de caseína (Otte y col., 2007) produjeron mayor actividad inhibitoria de la ACE que los hidrolizados de proteínas de suero de leche; sin embargo, también se han identificado péptidos de suero de leche, como el ALPMHIR, con una fuerte actividad antihipertensiva (Mullally y col., 1997). Otras enzimas proteolíticas, como alcalasa, termolisina, subtilisina y el tratamiento sucesivo con pepsina y tripsina, con el fin de simular la digestión gastrointestinal, han sido empleadas para liberar péptidos bioactivos inhibidores de la ACE (Pihlanto-Leppälä y col., 2000; Vermeirssen y col., 2004), antibacterianos (López-Expósito y Recio, 2006), antioxidantes (Pihlanto, 2006), inmunomoduladores (Gauthier y Pouliot, 2003) y opiáceos (Teschemacher, 2003). Aparte de la producción convencional de péptidos a partir de fuentes naturales de proteínas por enzimas proteolíticas, las técnicas de ADN recombinante han sido probadas con éxito para la producción de péptidos específicos o sus precursores en *Escherichia coli* (Kim y col., 1999).

Fermentación con bacterias ácido lácticas

La liberación de diferentes péptidos bioactivos a partir de proteínas de la leche por proteólisis con bacterias lácticas está bien documentado (Matar y col., 2003; Fitzgerald y Murray, 2006). En el caso de los péptidos antitrombóticos, no se han reportado péptidos generados por fermentación con esta función. Varios estudios han demostrado que durante las fermentaciones con *Lactobacillus helveticus*, se liberan péptidos antihipertensivos; los más conocidos son los tripéptidos VPP e IPP. El efecto de estos péptidos antihipertensivos se ha demostrado en ratones espontáneamente hipertensos y varios estudios en humanos (Nakamura y col., 1995; Sipola y col., 2002; Seppo y col., 2003). También las bacterias usadas para elaborar diferentes productos lácteos como yogur, diferentes quesos y productos comerciales con bacterias probióticas, pueden ser capaces de producir péptidos bioactivos durante la fermentación de la leche (Fuglsang y col., 2003; Gobbetti y col., 2004; Donkor y col., 2007). Chen y col. (2007) observaron que la fermentación de la leche con una mezcla de cultivos iniciadores comerciales de cinco bacterias ácido lácticas, seguida de la hidrólisis con una proteasa microbiana, aumentó la actividad inhibitoria de la ACE del hidrolizado obtenido; dos potentes inhibidores de la ACE, GTW y GVW, fueron identificados en el hidrolizado y también corroboraron el efecto antihipertensivo del hidrolizado en un estudio con ratas espontáneamente hipertensas. Donkor y col. (2007) estudiaron la actividad proteolítica de diversas bacterias ácido lácticas entre ellas algunas probióticas (*Lactobacillus*

acidophilus, *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus casei*), como factor determinante del crecimiento del cultivo y la producción de péptidos con capacidad de inhibir la ACE *in vitro* de la leche fermentada con estos cultivos individualmente; en todos los cultivos se liberaron péptidos inhibidores de la ACE durante el crecimiento de las bacterias en diferente proporción. Pihlanto-Leppälä y col. (1998) estudiaron la posible generación de péptidos inhibidores de la ACE de suero de queso y caseína durante la fermentación con diversos cultivos lácteos comerciales, utilizados en la fabricación de yogur y leches fermentadas. No se observó capacidad de inhibir la ACE de las leches fermentadas, sin embargo, la digestión adicional con las enzimas digestivas pepsina y tripsina, liberó péptidos inhibidores de la ACE derivados principalmente de α 1-caseína y β -caseína. Pihlanto y col. (2010) realizaron la fermentación de leche con 25 bacterias ácido lácticas para estudiar la capacidad de inhibir la ACE; en la mayoría de los casos la proteólisis durante la fermentación se correlacionó con la inhibición de la ACE; la modificación de las condiciones de fermentación o el control del pH no afectó la capacidad de inhibir la ACE. Sin embargo, Nielsen y col. (2009) realizaron un trabajo similar y no encontraron correlación entre el grado de proteólisis y la inhibición de la ACE, ellos sugieren que la correlación entre las condiciones de fermentación y la inhibición de la ACE depende de la cepa utilizada durante la fermentación.

Lactobacillus casei

Lactobacillus casei es una bacteria Gram-positiva, no motil, no esporulante, catalasa negativa. Sus células son bastones de 0.7-1.1 x 2.0-4.0 μ m, que tienden a formar cadenas (figura 6). *Lactobacillus casei* es una bacteria típica del queso, ha sido aislada mayormente de leche y productos lácteos, aunque también de forraje fermentado, de masa fermentada, del tracto intestinal humano, boca y vagina. Esta bacteria se distingue por su capacidad de crecer en sustratos raramente usados por otras bacterias lácticas (gluconato y malato); son necesarios para su crecimiento: riboflavina, ácido fólico, pantotenato de calcio y niacina. Su temperatura óptima de crecimiento es 30° C, aunque puede crecer a 15° C, sin embargo no a 45° C (Gobbetti, 1999).

Lactobacillus casei es frecuentemente encontrado en alimentos como leche cruda, quesos, leche fermentada, vegetales fermentados, salsas crudas y carne. Debido a su actividad benéfica para la salud, se ha utilizado en la fabricación de alimentos para aumentar la calidad de éstos y mejorar la salud humana o animal.

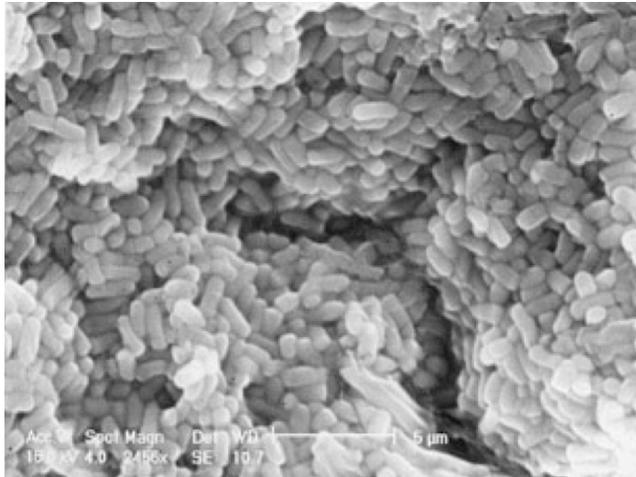


Figura 6. Micrografía electrónica de barrido de células de *Lactobacillus casei* (Gobbetti, 1999).

El uso terapéutico como probiótico de *Lactobacillus casei* ha sido ampliamente evaluado; en la actualidad, varias bacterias ácido lácticas, incluida *Lactobacillus casei*, se usan en alimentos o en preparaciones especiales por sus características probióticas. La actividad probiótica es inherente a la especie. *Lactobacillus casei* puede colonizar el intestino de varios mamíferos, de esta forma puede prevenir la estancia en el intestino de bacterias patógenas compitiendo con éstas por los receptores de glicoesfingolípidos a los que se une. Se ha demostrado que la administración parenteral de *Lactobacillus casei* Shirota tiene actividad antitumoral e inmunoestimuladora en tumores químicamente inducidos en animales; se ha observado la reducción de número y tamaño de los tumores y la estimulación de linfocitos y células naturales *killer*, que destruyen las células tumorales (Watanabe y Mike, 1999)

Streptococcus thermophilus

El género *Streptococcus* incluye especies de bacterias Gram-positivas que tienen propiedades metabólicas similares, pero que viven en ecosistemas diferentes y tienen varias diferencias fisiológicas entre ellas. Algunos estreptococos son patógenos, otros son parte de la flora normal de humanos animales y alimentos. *Streptococcus thermophilus* es como la mayoría de las bacterias ácido lácticas, no esporulante, catalasa negativa, anaerobio facultativo. Microscópicamente se presenta como células esféricas u ovoides de 0.7-0.9 μm de diámetro; cuando crece en medio líquido aparece en pares o cadenas (figura 7). La temperatura de crecimiento óptimo es alta, de 42-45° C. Como otros estreptococos, *Streptococcus thermophilus* es heterotrófico, requiere de carbohidratos simples como fuente de energía y aminoácidos como fuente de nitrógeno. Es sensible a la sal: no crece en presencia de 4% de NaCl, ni en medios muy alcalinos (pH 9) (Zirnstein, 1999).

Como otras bacterias ácido lácticas *Streptococcus thermophilus* esta bien adaptado al ambiente de la leche. Esta puede ser aislada de la leche, instrumentos de la industria de los lácteos y especialmente de la leche calentada; a diferencia de bacterias como *Lactococcus lactis* y otras bacterias lácticas, éste no se ha encontrado en plantas verdes o de fuentes clínicas. No se conoce otro hábitat para esta bacteria además de la leche; dado que puede resistir altas temperaturas (60° C por 30 min), es común encontrar a *Streptococcus thermophilus* en equipo para pasteurizar leche o productos lácteos. (Zirnstein, 1999).

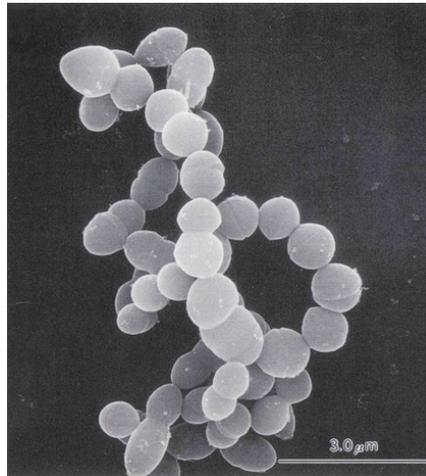


Figura 7 Micrografía electrónica de barrido de *Streptococcus thermophilus* CNRZ1066, por Lloyd G.Simonson, ASM Microbe Library from NCBI.

Debido a su naturaleza termofílica moderada *Streptococcus thermophilus* sobrevive y produce ácido a temperaturas tan altas, que otras bacterias ácido lácticas no podrían sobrevivir a estas mismas condiciones; esta característica hace que esta bacterias sea muy útil en la fermentación de productos lácteos como el yogur o el queso que pueden ser fabricados o madurados a temperaturas altas. Los beneficios de este cultivo iniciador son debidos principalmente a su capacidad de fermentar lactosa de forma homoláctica y disminuir rápidamente el pH hasta 4.5 o menos, provocando la precipitación de las caseínas. En todos los productos lácteos en los que se usa *Streptococcus thermophilus*, también se usa un lactobacilo compatible (Ej. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*); el llamado comportamiento simbiótico de crecimiento entre *Streptococcus thermophilus* y los lactobacilos usados en los productos lácteos ha sido de gran interés (Rajagopal y Sandine, 1990; Moreira y col. 2000). Además de su capacidad de producir ácido láctico en los productos lácteos, *Streptococcus thermophilus* también pueden sintetizar otros productos, sobre todo compuestos relacionados con el sabor y la textura (polisacáridos).

Sistema proteolítico

La proteólisis de las proteínas de la leche por bacterias ácido lácticas se ha estudiado con gran detalle por métodos genéticos y bioquímicos. De estos estudios resulta la imagen de los sistemas proteolíticos de lactococos y lactobacilos, los cuales son muy similares en sus componentes y modo de acción (Kunji y col., 1996). El sistema consiste en una proteinasa extracelular, los sistemas de transporte específicos para dipéptidos, tripéptidos y oligopéptidos (más de tres residuos) y una gran variedad de peptidasas intracelulares (figura 8).

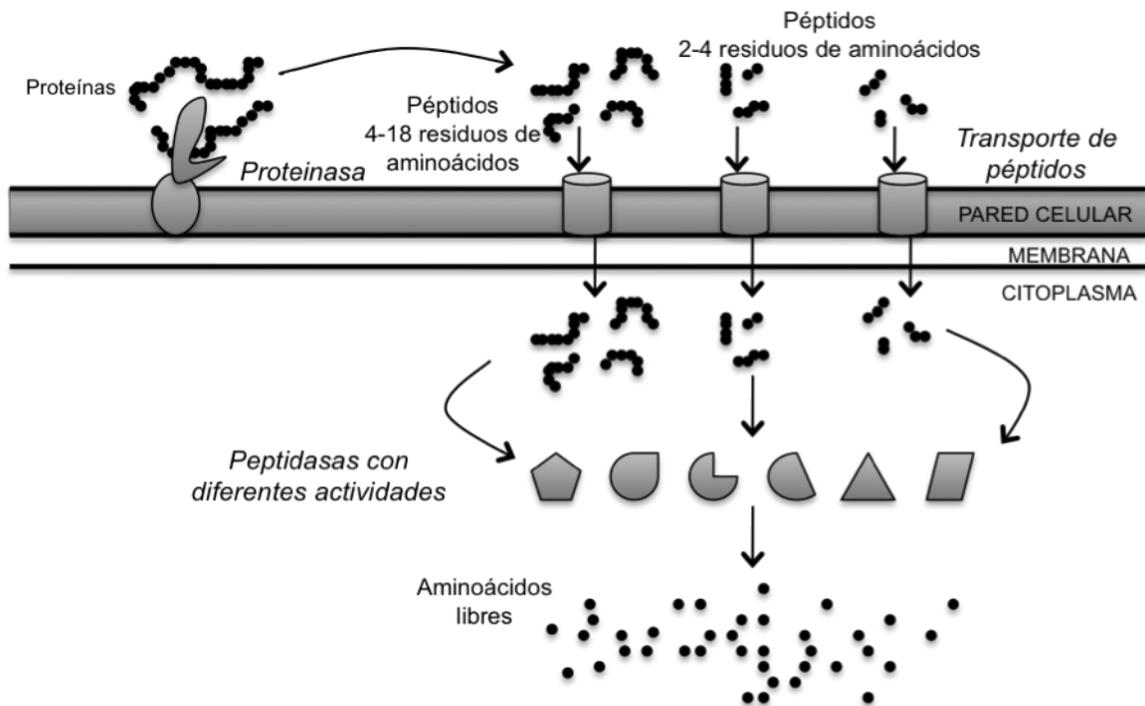


Figura 8. Sistema proteolítico de bacterias ácido lácticas (Savijoki y col., 2006).

Sistema proteolítico de *Lactobacillus casei*

Son varias las enzimas proteolíticas de *Lactobacillus casei* que se han purificado y caracterizado (tabla 2), sobre todo por su papel en la maduración de quesos. Las características comunes de estas enzimas son la actividad óptima entre 30° y 40° C y un pH de 6.5-7.5, aunque mantienen actividad considerable a temperaturas y pH bajos. Se ha purificado serina-proteasas de pared celular (PrtP) de masa molecular de 180 kDa de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei*; la proteinasa original sin procesar tiene 1902 residuos de aminoácidos, y la secuencia primaria comparte un 9% de homología con las proteinasas de *Lactococcus* (Kojic y col., 1991). Las diferencias se presentan solamente en

dos posiciones que son importantes para la especificidad y la unión del sustrato (Gobbetti, 1999). Se requiere una enzima proteolítica para la activación de la proteinasa de pared celular, el extremo N-terminal de está es el dominio catalítico. La especificidad de las proteinasas aisladas de *Lactobacillus casei* difiere en las enzimas que solamente hidrolizan la β - caseína o en las enzimas con una especificidad amplia. Normalmente la actividad proteinasa es más débil que la actividad peptidasa; se ha observado diferencias entre subespecies de *Lactobacillus casei* en cuanto a la actividad aminopeptidasa, dipeptidasa y tripeptidasa (Gilbert y col., 1997).

Otro paso en la utilización de las proteínas incluye el transporte de los péptidos y aminoácidos generados por las proteinasas de pared celular al interior de la célula. El sistema de transporte de varios aminoácidos se realiza por mecanismos dependientes y no dependientes de gradiente de protones (Strobel y col. 1989). En cuanto a los péptidos resultantes, el transporte de oligopéptidos es el más importante para la nutrición de la célula (Kunji y col., 1998). El sistema Opp transporta oligopéptidos, este pertenece a una súper familia de proteínas transmembranales, muy conservada, que utiliza ATP (transportador ABC) para traslocar diferentes sustratos a través de la membrana, y es el que interviene en la absorción de péptidos derivados de las proteínas de la leche (Doeven y col., 2005).

Tabla 2. Enzimas proteolíticas purificadas y caracterizadas de *Lactobacillus casei* (Gobbetti, 1999).

Cepa	Enzima	Tipo	pH	Localización
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> NH1	Proteinasa	Enzima-serina	N. D. ^a	Pared celular
<i>Lb. casei</i> subsp <i>casei</i> NCDO151	Proteinasa	Enzima-serina	6.5	Pared celular
<i>Lb. casei</i> subsp <i>casei</i> LLG	Aminopeptidasa	Metaloenzima	7.0	Intracelular
<i>Lb. casei</i> subsp <i>casei</i> LLG	X-prolil dipeptidil peptidasa	Enzima-serina	7.0	Intracelular
<i>Lb. casei</i> subsp <i>casei</i> UL21	X-prolil dipeptidil peptidasa	Enzima-serina	7.0	Intracelular
<i>Lb. casei</i> subsp <i>casei</i> UL26	X-prolil dipeptidil peptidasa	Enzima-serina	7.0	Intracelular
<i>Lb. casei</i> subsp <i>casei</i> LLG	Prolin iminopeptidasa	Enzima-cisteina	7.5	Intracelular

^aNo determinado

Sistema proteolítico de *Streptococcus thermophilus*

El sistema proteolítico de *Streptococcus thermophilus* comprende más de 20 enzimas proteolíticas; la capacidad de *Streptococcus thermophilus* para satisfacer sus requerimiento de aminoácidos, necesarios para su crecimiento en la leche, es diferente a la de otras bacterias ácido lácticas. Sus requerimientos de aminoácidos se satisfacen por el rendimiento de su capacidad de biosíntesis y por la cooperación con otras especies de bacterias que

crecen en asociación, en productos lácteos, como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Las proteinasas de pared celular son reportadas en sólo una minoría de las cepas de *Streptococcus thermophilus* (Fernández-Espla, y col. 2000). Algunas cepas de *Streptococcus thermophilus* parecen ser auxótrofas, al menos a cuatro aminoácidos: ácido glutámico, cisteína, histidina, y metionina, aunque en otros estudios se ha observado que son más exigentes (Hols y col., 2005; Letort y Juillard, 2001). El análisis de su genoma ha revelado una conservación, relativamente alta, de genes funcionales de la biosíntesis de aminoácidos, lo que podría reflejar la importancia de la síntesis de aminoácidos para el crecimiento de esta especie en leche (Garault y col., 2000; Hols y col., 2005; Monnet y col., 2005). *Streptococcus thermophilus* también ha sido estudiado por su capacidad de hidrolizar las proteínas de suero de leche más importantes, β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, para aumentar su digestibilidad y disminuir su alergenicidad (Iyer y col., 2010).

Streptococcus thermophilus, como otras bacterias ácido lácticas, cuenta con una gran variedad de peptidasas con diversas especificidades, que la hacen capaz de liberar aminoácidos diversos. Esta bacteria tiene las suficientes peptidasas para cumplir con su requerimiento de compuestos nitrogenados; posiblemente estén relacionadas con la capacidad de *Streptococcus thermophilus* de desarrollar sabores en quesos al liberar aminoácidos que pueden ser precursores de los compuestos que dan el sabor (Rul y Monnet, 1997).

Además de la proteasa de la pared celular, el sistema de transporte de oligopéptidos es una de las funciones necesarias para el crecimiento óptimo de *Streptococcus thermophilus* en leche. Este sistema de transporte de oligopeptidos es un transportador ABC, que es común en las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. En este caso el sistema conocido como Ami, se compone de AmiC y AmiD, proteínas integrales de membrana, y AmiE y AmiF, las proteínas de unión a ATP y una proteína de unión al sustrato, AmiA1. Garault y col. (2002) encontraron dos proteínas más de unión al sustrato: AmiA2 y AmiA3. Este sistema de transporte de oligopéptidos de *Streptococcus thermophilus*, tiene la capacidad para transportar moléculas de 3 a 23 residuos de aminoácidos

Streptococcus thermophilus es una bacteria atípica; en la familia de las bacterias ácido lácticas ya que ésta es la única especie en el caso del género que no es patógena y puede utilizarse en la preparación de varios alimentos. El medio natural conocido para el desarrollo de *Streptococcus thermophilus* es la leche, como ya se ha mencionado, un medio en el que el transporte de oligopéptidos es esencial para el crecimiento. El sistema de transporte de

oligopéptidos que se ha descrito en esta bacteria también es atípico. Garult y col. (2002) observaron, una preferencia por oligopéptidos hidrofóbicos similares a los encontrados en otras bacterias ácido lácticas; sin embargo, a pesar de que un transportador ABC está involucrado tanto para *Streptococcus thermophilus* como para otras bacterias ácido lácticas, como *Lactobacillus casei*, la organización de los sistemas difiere claramente. El sistema descrito presenta tres proteínas de unión a oligopéptidos, que tienen sólo 24.2% de identidad con la única proteína de unión a oligopéptidos conocida en el sistema Opp (*Lactobacillus casei*). La organización del sistema con tres proteínas de unión es claramente del tipo del género *Streptococcus*; sin embargo, la especificidad del transporte de oligopéptidos que se describe para *Streptococcus thermophilus* (Juille y col., 2005) es considerablemente más amplia que la que se ha reportado para otros *Streptococcus*.

Proteínas de la leche

Los péptidos bioactivos se pueden obtener de fuentes animales y vegetales; en sangre de bovino, gelatina, carne, huevos y varias especies de peces como el atún, la sardina, el arenque y el salmón, así como en el trigo, maíz, soya, arroz, setas, calabaza y sorgo (Möller y col., 2008). En la actualidad, la leche y los productos lácteos, se consideran las mayores fuentes de péptidos bioactivos.

La leche es una secreción de la glándula mamaria que contiene lactosa, proteínas, lípidos y sales minerales. El valor nutricional de la leche y los productos lácteos se debe a estos compuestos. Los ingredientes de la leche pueden proveer elementos altamente nutritivos, protección inmunológica y sustancias biológicamente activas, tanto para neonatos como para adultos (Séverin y Wenshui, 2005).

Las proteínas de la leche se pueden separar en dos grandes categorías, en función de su solubilidad a un pH de 4.6, 20° C. En estas condiciones, un fracción de las proteínas de la leche se precipita: estas son conocidas como las caseínas. Las proteínas que permanecen solubles en estas condiciones se conocen como proteínas del suero. Aproximadamente el 80% del total del nitrógeno de la leche en las especies bovina, ovina, caprina y la de búfalo, se aporta por las caseínas, aunque en la leche humana, esta sólo representa alrededor del 40% de la proteína. Tanto las caseínas y como las proteínas del suero de leche son muy heterogéneas y tienen propiedades moleculares y fisicoquímicas muy diferentes.

Caseínas

Las caseínas bovinas se componen de cuatro tipos de proteínas con propiedades diferentes: α_{s1} , α_{s2} , β y κ , los cuales representan aproximadamente el 38%, 10%, 36% y 12% de total de caseínas, respectivamente. Las caseínas son proteínas muy bien caracterizadas; son moléculas muy pequeñas, con una masa molecular de 20 a 25 kDa. Los componentes menores de la caseína son las γ caseínas, fragmentos del extremo C-terminal de la β -caseína producida por la acción de la plasmina (proteínasa presente en la leche); las proteosomas peptonas son los fragmentos correspondientes al extremo N-terminal. Todas las caseínas presentan polimorfismo genético, que consiste en la sustitución de uno o dos aminoácidos y, en raras ocasiones, la supresión de una secuencia de hasta 14 residuos de aminoácidos (Fox, 2001).

Todas las caseínas son fosforiladas; los grupos fosfato están esterificados como monoésteres de serina y la mayoría agrupados. Los grupos fosfato se unen fuertemente a cationes polivalentes; en la leche, el principal catión al que se unen es el calcio, aunque también lo hacen en pequeñas cantidades a otros cationes, como el zinc. La unión de cationes provoca la neutralización de la carga y la precipitación de α_{s1} , α_{s2} y β caseínas (bajo ciertas condiciones); la κ -caseína, que normalmente contiene solo un grupo fosfato, se une a los cationes débilmente y no es precipitada por ellos.

Sólo la α_{s2} y la κ -caseína contienen cisteína, quien normalmente forma enlaces disulfuro intermoleculares. La α_{s2} -caseína generalmente se presenta como dímero ligado por enlaces disulfuro, mientras que se pueden ligar hasta diez moléculas de κ -caseína de esta forma. La ausencia de cisteína o cistina en α_{s1} y β -caseínas aumenta la flexibilidad de estas moléculas.

Todas las caseínas, especialmente la β -caseína, contiene un alto nivel de prolina; en la β -caseína, 35 de los 209 residuos son de prolina, estos se distribuyen uniformemente a lo largo de la molécula. La presencia de un alto nivel de prolina impide la formación de estructuras secundarias (α -hélices, β -hojas y giros β)

Las caseínas tienen bajos niveles de estructura secundaria y terciaria, aunque los cálculos teóricos indican que tienen un cierto grado de estructuras superiores. Se ha sugerido que en lugar de carecer de estructuras secundarias, las caseínas tienen estructuras muy flexibles e inestables, estas han sido descritas como reomórficas (Fox, 2001). La falta de estructuras estables secundarias y terciarias hace que las caseínas sean estables ante agentes desnaturalizantes como el calor o la urea, lo que les da buenas propiedades espumantes y

emulsificantes; las hace susceptibles a la proteólisis, lo cual es importante en la maduración de los quesos y en la producción de hidrolizados de proteínas.

Las caseínas son relativamente hidrofóbicas, en su superficie presentan alta hidrofobicidad (debido a sus estructuras abiertas). Los residuos hidrofóbicos, polares y cargados no están distribuidos uniformemente a lo largo de la secuencia de aminoácidos de la molécula: se observan en forma de parches hidrofóbicos o hidrofílicos; esto les da a las caseínas estructuras fuertemente anfipáticas, lo que las hace altamente tensoactivas. El extremo N-terminal de la κ -caseína, que es particularmente importante en la fabricación del queso, es fuertemente hidrofóbico mientras que el extremo C-terminal es muy hidrofílico. La hidrofobicidad de las caseínas explica por qué sus hidrolizados tienen una alta propensión al amargor (son ricos en aminoácidos hidrófobos que generan dicho sabor), que es una de las principales características de muchas variedades de queso.

Proteínas del suero de leche

La fracción de proteína del suero de leche de vaca contiene cuatro proteínas principales: la β -lactoglobulina (50%), la α -lactoalbúmina (20%), la seroalbúmina (10%) y las inmunoglobulinas (10%). Las proteínas de suero de leche también han sido bien caracterizadas; en contraste con las caseínas, las proteínas del suero sí presentan estructuras secundarias, terciarias y, en la mayoría de los casos, cuaternarias. Son típicas las proteínas globulares y se desnaturalizan completamente por calentamiento, a 90° C por 10 min. Estas no están fosforiladas y por lo tanto no son sensibles a los cationes de calcio. Todas las proteínas de suero de leche contienen enlaces disulfuro intramoleculares, los cuales estabilizan su estructura. La β -lactoglobulina contiene un grupo sulfhidrilo que se encuentra de forma interna dentro de la molécula de la proteína nativa, pero queda expuesto y activo al desnaturalizarse la proteína; esto puede darse por la acción de varios agentes (ej. calor). Bajo esta forma se pueden dar interacciones disulfuro (S-S) con ella misma u otras proteínas. La más importante de estas interacciones es la que se da con la κ -caseína, que se produce al calentar la leche a 75° C o más por 15 segundos. Esta interacción afecta fuertemente muchas propiedades tecnológicamente importantes de la leche, relacionadas con la estructura, como las propiedades reológicas y las propiedades de la leche gelificada por cuajo o por coagulación ácida (incluyendo yogurt y quesos frescos) así como la estabilidad térmica de la leche y productos lácteos (Fox, 2001).

Las proteínas del suero poseen importantes propiedades nutricionales y biológicas en particular con respecto a la prevención de enfermedades. Varias propiedades benéficas para la salud han sido reportadas: antimicrobiana, anticancerígena, inmunoestimulantes entre otras (Madureira y col. 2007). Los productos lácteos y sus componentes, principalmente el suero de leche, contribuyen a la regulación de la masa corporal, proporcionando señales de saciedad. Los productos lácteos de alto contenido proteico, en particular, aquellos que contienen proteínas de suero de leche, pueden reducir el acumulación de grasa y mejorar la sensibilidad a la insulina (Ebringer y col., 2008).

Objetivos

Objetivo general

Identificar los péptidos bioactivos liberados de caseínas y proteínas de suero de leche en las fermentaciones con *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*.

Objetivos específicos

- Establecer el tiempo de máxima producción de péptidos inhibidores de la ACE y de la actividad antitrombótica durante las cinéticas de fermentación con *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus* en suero de leche y caseínas.
- Identificar las fracciones peptídicas que inhiban la ACE y la actividad antitrombótica, de las fermentaciones con *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus* en suero de leche y caseínas.
- Purificar los péptidos que inhiban la ACE y la actividad antitrombótica, encontrados en las fermentaciones con *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus* en suero de leche y caseínas.
- Probar la resistencia de los péptidos bioactivos encontrados frente a las enzimas digestivas.

Hipótesis

Ya que durante la fermentación de la leche con *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus* se producen diversos péptidos a partir de las proteínas del suero de leche y de las caseínas, dichos péptidos pueden presentar diferente bioactividad.

Material y métodos

Estrategia general

La estrategia general que se siguió se muestra en la figura 9, ésta consiste en la obtención de los péptidos bioactivos producidos por fermentación láctica, su posterior purificación tratamiento con enzimas gástricas e identificación molecular.

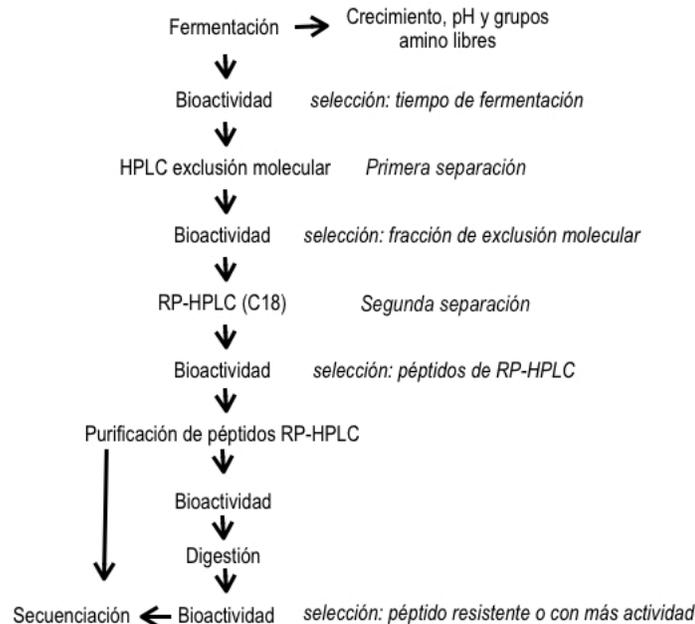


Figura 9. Esquema general de la metodología llevada a cabo.

Se realizaron cuatro fermentaciones diferentes con dos fuentes de nitrógeno distintas: proteínas de suero de leche y caseínas; y dos bacterias: *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*. La selección de las muestras en cada paso (fermentación, HPLC, digestión), se realizó tomando en cuenta los valores más altos de bioactividad presentada, según fuera el caso: inhibición de la ACE o actividad antitrombótica.

Los procedimientos para la elaboración de los medios de cultivo y las soluciones utilizados en las técnicas que a continuación se mencionan, así como los reactivos y las curvas patrón utilizados se encuentran en la sección anexos.

Aislamiento de bacterias

Lactobacillus casei Shirota y *Streptococcus thermophilus* se utilizaron para llevar a cabo las fermentaciones en los dos sustratos: proteínas del suero de leche y caseínas. *Lactobacillus casei* Shirota se obtuvo del producto lácteo Yakult y *Streptococcus thermophilus* de Soful®, ambos producidos por Yakult® de México. Ambos microorganismos fueron aislados por dilución y estría en placas de agar. Se usó el medio de cultivo Mann Rogosa Sharpe (MRS):

- El producto se diluyó en agua peptonada al 0.5 % (una asada en 10 mL) en condiciones estériles y se realizaron varias diluciones.
- Todas las diluciones fueron sembradas en placas con agar MRS por estría.
- Las placas se incubaron durante 48 hr a 37°C
- Se tomaron colonias aisladas y se resembraron por estría hasta obtener un cultivo puro

A partir de la última estría se comprobó el aislamiento; se hicieron frotis para observar la morfología colonial con tinción de Gram al microscopio. Una vez aisladas, las dos bacterias se mantuvieron en refrigeración (-4° C) en tubos de agar MRS hasta el momento de ser utilizadas.

Fermentación

Ambas bacterias fueron propagadas en leche descremada; se incubaron durante 24 h a 37° C (hasta alcanzar un pH aproximado de 5). Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 125 mL con un volumen de trabajo de 50 mL, en medio con caseínas o proteínas de suero de leche (WPC) como fuente de nitrógeno; el procedimiento fue el mismo para cada fermentación. Los matraces fueron inoculados con 5% v/v de cultivo (1×10^7 UFC mL⁻¹) y se incubaron por 42 hr a 37° C. Se monitoreó el pH. Se tomaron muestras de 3.5 mL más para determinar los grupos amino libres (TNBS) y la bioactividad. Los tiempos de muestreo fueron: 0,15, 21, 27, 36 y 42 hr (se usaron dos matraces desfasados, para poder tomar todas las muestras mencionadas).

Cuenta de unidades formadoras de colonia

El crecimiento de las bacterias durante la fermentación se monitoreó mediante cuenta en placa. Se realizaron diluciones de 1×10^{-4} en las muestras de las primeras 24 hr y diluciones de 1×10^{-5} en las últimas muestras tomadas. Las diluciones se realizaron en tubos de ensaye con 9.9 mL o 9 mL según el caso, con agua peptonada al 0.5 %. De las diluciones se tomaron 5 μ L y se sembraron en placas con agar MRS divididas en cuadrantes (Miles y Misra, 1938). Se dejaron secar por aproximadamente una hora antes de incubar a 37° C. La cuenta se llevó a cabo para *Lactobacillus casei* Shirota a las 48 hr de incubación, mientras que para *Streptococcus thermophilus* se contaron las colonias a las 24 hr de incubación.

Tratamiento de muestras

Las muestras tomadas durante la fermentación para su análisis posterior, se trataron en todos los casos de la misma forma: se tomaron 3.5 mL de cada fermentación en cada tiempo (0, 15, 21, 27, 36 y 42 hr), se ajustó el pH a 9 y se agitaron hasta estar completamente resuspendidas (durante la fermentación con caseínas estas se precipitan por el cambio de pH en el medio); se centrifugaron (centrifuga Beckman® J2-MI, Rotor Beckman® JA-20.1, EUA) a 25,000 g durante 30 min a 4°C; una vez centrifugada la muestra, se tomó el sobrenadante y se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta el momento de efectuar la pruebas correspondientes.

Determinación de grupos amino libres (TNBS)

El grado de proteólisis durante la fermentación se determinó por la técnica del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS); éste se basa en la reacción de dicho ácido con grupos amino en un medio ligeramente alcalino (Freedman y Radda, 1968). El complejo resultante es un cromóforo de color naranja y percibe un máximo de absorbancia a 340 nm (Jesse y Choi, 1970). El procedimiento que se siguió fue:

- Se agregaron 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.2125 M, pH 8.2 en tubos de ensaye forrados con papel aluminio (la reacción es sensible a la luz).
- Se adicionaron a cada tubo 250 μ L de muestra (diluida 10 veces la solución amortiguadora de fosfatos). En el caso del tubo blanco en lugar de muestra se agregó agua desionizada.

- Se agregaron 2 mL de TNBS al 0.10 % en amortiguador de fosfatos 0.2125 M pH 8.2 (la preparación de esta solución se realizó en la oscuridad justo antes de llevar a cabo la prueba), se agitó cada tubo para homogenizar la solución.
- Se incubó la mezcla durante una hora a 50° C en la oscuridad.
- Enseguida se paró la reacción adicionando a cada tubo 4 mL de ácido clorhídrico 0.1 N y se agitaron para homogenizar la solución.
- Por último se leyó su absorbencia a 340 nm de longitud de onda contra el blanco; en celdas de cuarzo en un espectrofotómetro Shimadzu ®, UV-160 A (Japón). Se realizó una curva patrón usando glicina (gli), los resultados se presentan como concentración de glicina (mg mL⁻¹).

Determinación de inhibición de la ACE

Se determinó la capacidad de inhibir la ACE (Cushman y Cheung, 1971) a las muestras de fermentación, a las fracciones obtenidas por la columna de exclusión y a los péptidos purificados. A las muestras de la fermentación se les ajustó el pH con hidróxido de sodio 10 N (pH 8.3) y las muestras obtenidas por HPLC se liofilizaron y posteriormente se resuspendieron en amortiguador de borato 0.1 M, NaCl 0.3 M, pH 8.3; la reacción se llevó a cabo como reporta Fulgsang y col. (2002); el ácido hipúrico resultante de la reacción se determinó por el método de Hayakari y col. (1978).

- Se tomaron 80 µL de las muestras.
- Se agregaron 200 µL de amortiguador de borato 0.1 M, pH 8.3, con el sustrato hipuril-histidil-leucina (HHL) con una concentración 5 mM (preparado ese mismo día).
- Fueron adicionados 20 µL de 0.5 U/mL de ACE en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M y cloruro de sodio 0.4 M, pH 8.3.
- Los tubos de reacción se incubaron durante 30 min a 37° C.
- La reacción se detuvo incubando los tubos 10 min a 95° C.
- Se agregaron 3.5 mL de amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 8.3 y se agitó para homogenizar.

- Se adicionó 1.5 mL de 2, 4, 6 tricloro-S-triazina (TT) al 3% en dioxano, se agitó cada tubo por 20 segundos (hasta observar el líquido completamente transparente).
- Se centrifugó a 10 000 g, durante 10 min a 15° C.
- El sobrenadante se leyó la absorbencia contra agua destilada a 382 nm en celdas de cuarzo con un espectrofotómetro Shimadzu ®, UV-160 A (Japón)

El control con 0% de actividad fue medido sustituyendo los 20 µL de ACE por agua destilada, y el 100% de actividad sustituyendo la muestra (inhibidor) por 80 µL de amortiguador de borato 0.1 M, pH 8.3 sin sustrato. Para las muestras de fermentación se realizó un blanco (sin enzima) de cada tiempo, debido a que podría reaccionar el TT con algunos aminoácidos presentes en el medio (Suzuki y col., 1970). El porcentaje de inhibición fue obtenido mediante la ecuación 1 (Gobbetti y col., 2000):

$$\%inhibición = \frac{B - A}{B - C} \times 100, \quad (1)$$

donde: A es la absorbancia de la reacción con ACE, sustrato e inhibidor (muestra);

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

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

Los resultados se presentan como inhibición específica, que se define como el cociente del porcentaje de inhibición y la concentración de péptidos de la muestra ($\mu\text{g mL}^{-1}$, determinada por HPLC).

Determinación de la actividad antitrombótica

La actividad antitrombótica se determinó por el método de Yang y col. (2007) en el que se mide la inhibición de la trombina, enzima encargada de convertir el fibrinógeno en fibrina, forma activa indispensable para la formación del coágulo:

- Se colocaron 140 µL de fibrinógeno 0.1% en amortiguador Tris-HCL 0.05M pH 7.2 con NaCl 0.12mM.
- Se agregaron 40 µL de muestra (diluida 2 veces en amortiguador) o amortiguador (100% de actividad).

- Se incubó durante 10 min a 37° C.
- Se leyó a 405 nm.
- Se agregaron 10 µL de trombina 12 U/mL en amortiguador o solo el amortiguador (0% actividad).
- Se incubó durante 10 min a 37° C.
- Se leyó a 405 nm.

Se llevó a cabo la prueba en un lector de Elisás, el porcentaje de inhibición se cálculo con la ecuación 2 (Zhang y col. 2008):

$$\%inhibición = \frac{(A - B) - (C - D)}{A - B} \times 100, \quad (2)$$

donde: A es la absorbancia inicial del fibrinógeno (control).

B es la absorbancia después de agregar la trombina e incubar (control).

C es la absorbancia inicial de la muestra con fibrinógeno.

D es la absorbancia después de agregar la trombina a la muestra e incubar (muestra).

Purificación de péptidos (HPLC)

Fraccionamiento de las muestras (exclusión molecular)

Las muestras de fermentación que mostraron mayor bioactividad se filtraron (filtros de 0.2 µm de membrana de nylon, Titan® 2 HPLC filter purple, Rockwood, TN, EUA) antes de ser inyectadas en un HPLC (Lab Alliance®, State College, PA, EUA) en una columna de exclusión molecular (BioSep-Sec-S® 2000, 300x7.8 mm, 5µ, Phenomenex®, EUA) para obtener fracciones de peso molecular conocido. Se realizaron separaciones isocráticas de 25 min, el flujo fue de 0.9 mL min⁻¹; la fase móvil fue amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 6.8 (procedimiento según el fabricante de la columna), se utilizó un detector de arreglo de diodos (Spectra System® UV6000LP de Thermoseparation products®, EUA); la determinación se hizo a 280, 254 y 215 nm; a estas longitudes de onda se observan fenilalanina (254 nm) y triptófano (280 nm) y los enlaces peptídicos (215 nm). Bajo estas mismas condiciones se analizó también un patrón de polipéptidos con un rango de 1.42 kDa a 26.63 kDa para

determinar los pesos moleculares de las fracciones obtenidas por medio de una curva patrón. Se inyectó también el péptido corazonina para construir una curva patrón y calcular la concentración de los péptidos. Las concentraciones se calcularon a 254 nm que fue la longitud de onda en la que mejor se definieron los picos.

Purificación de fracciones (fase reversa, gradiente)

La purificación de las fracciones con mayor actividad antihipertensiva obtenidas por exclusión molecular se realizó por HPLC (bomba Lab Alliance®, State College, PA, EUA) en fase reversa (RP) con una columna Jupiter® 5µ C18 300Å (250x4.6 mm, Phenomenex®, EUA). Los péptidos eluyeron en un gradiente lineal: solvente A (0.1% ácido trifluoroacético (TFA) a 70%) solvente B (0.1% TFA en acetonitrilo (ACN): 0.1% TFA, 9:1) en un lapso de 30 min, con un flujo de 1 mL min⁻¹ (procedimiento según el fabricante de la columna); se determinaron con un detector de arreglo de diodos (Spectra System Thermostepparation products®, EUA) a 280, 254 y 215 nm.

Confirmación de pureza (fase reversa, isocrático)

Para comprobar la pureza de los péptidos obtenidos se realizaron corridas isocráticas en la columna Jupiter® 5µ C18 300 Å; la composición de la fase móvil usada fue calculada para cada péptido, según el tiempo en el que eluyó durante el gradiente (purificación de fracciones) restando el 10% de su composición al solvente B y sumándolo al solvente A, en corridas de 20 min con un flujo de 1 mL min⁻¹.

Digestión con pepsina y tripsina

Se probó la resistencia de los péptidos purificados, a la acción de las enzimas gástricas pepsina y tripsina. Este procedimiento se realizó simulando las condiciones *in vivo* del tracto gastrointestinal (Ohsawa, y col., 2008).

- Se resuspendió los péptidos en 100 µL de solución acuosa pH 2 ajustada con HCl 10 N.
- Se hidrolizó primero con 50 µL de pepsina (pH de la reacción 2) a 37° C por 90 min, con agitación constante a 150 rpm.
- La reacción fue detenida por calentamiento (95° C por 10 min).
- La mezcla de reacción se neutralizó (pH 7) con NaOH 10 N.

- Posteriormente se agregaron 50 µL de tripsina (pH de la reacción 7.5) y se incubó por 240 min a 37° C, con agitación constante a 150 rpm.
- La reacción fue detenida por calentamiento (95° C por 10 min).

En ambos casos la relación enzima : sustrato fue de 1:25 (w/w). La muestra resultante fue analizada por HPLC-RP, para determinar la cantidad de péptidos remanente, y de esta forma constatar su estabilidad ante la digestión gástrica.

Identificación de péptidos

La identificación de los péptidos inhibidores de la ACE purificados se determinó por medio de espectrometría de masas MALDI -TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization). Las secuencias encontradas fueron comparadas con un porcentaje de similitud de 95-99% en el programa Protein Pilot®; se reconfirmó el resultado por medio de la base de datos protein BLAST® que nos permitió realizar una búsqueda de las secuencias, se tomaron los resultados con mayor Score y menor valor de E, los cuales indican los alineamientos idénticos encontrados según el número y posición de los aminoácidos y el número de secuencias que se puede esperar ver por casualidad, respectivamente. La espectrometría de masas fue realizada en un equipo Ettan Spot Handling Workstation® en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) en México D.F.

Análisis estadístico

Las fermentaciones, las determinaciones de grupos amino libres y las pruebas de inhibición de la ACE y de la actividad antitrombótica de las muestras de fermentación y de las fracciones colectadas por exclusión molecular, se realizaron por triplicado; se aplicó un análisis de varianza ANOVA (P > 0.05) a dichos resultados. Las pruebas de bioactividad de los péptidos purificados se realizaron por duplicado, y se les aplicó la prueba t-student. El análisis estadístico se realizó en el programa NCSS® 2001. Los resultados se expresaron como la media ± la desviación estándar.

Resultados y discusión

Fermentaciones con *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus* con proteínas de suero de leche y caseínas

Crecimiento y pH durante las fermentaciones

En cuanto al crecimiento de las bacterias en los diferentes sustratos, es evidente que ambos microorganismos presentan diferencias en su crecimiento según el sustrato. En la figura 10 se observa el crecimiento de los cuatro cultivos: *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*, en medio con proteínas de suero de leche o con caseínas. *Lactobacillus casei* Shirota presenta un crecimiento más rápido en proteínas de suero de leche que en caseínas, aumentando a las 15 hr más de una unidad logarítmica; en este último sustrato el crecimiento no alcanzó una clara fase estacionaria, mientras que en proteínas de suero de leche se alcanzó esta fase a las 15 hr. En el caso de *Streptococcus thermophilus*, en proteínas de suero de leche se alcanzó la fase estacionaria a las 9 hr, mientras que en caseínas se alcanzó a partir de las 15 hr; con una mayor biomasa a lo largo de toda la fermentación en comparación con la fermentación en suero de leche.

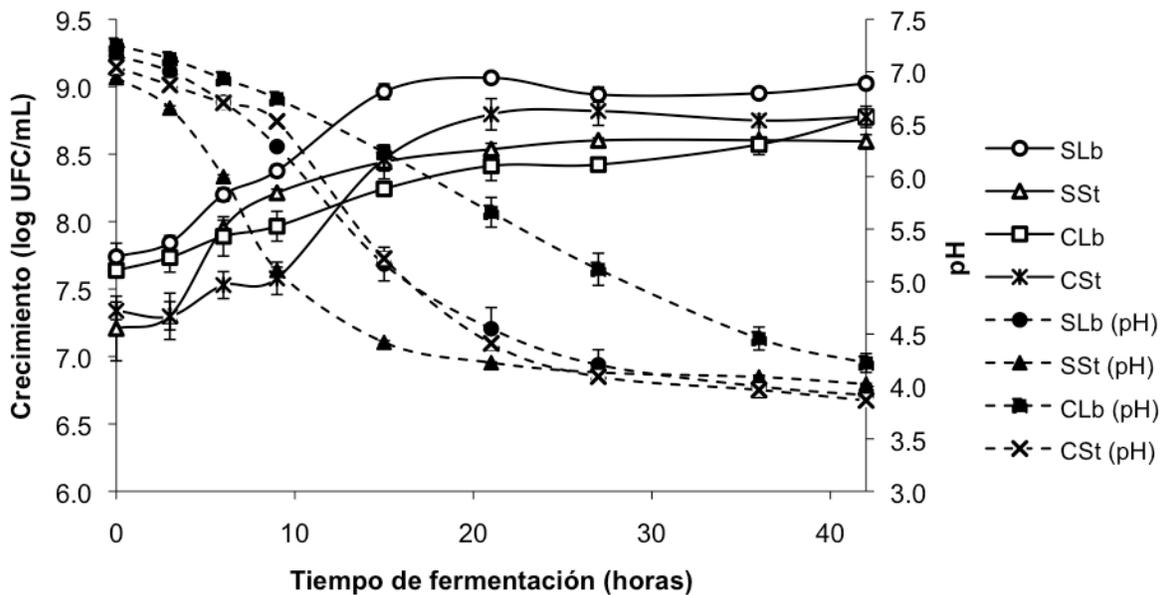


Figura 10. Evolución del crecimiento y pH durante las fermentaciones: *Lactobacillus casei* Shirota en proteínas de suero de leche (SLb) y caseína (CLb) y *Streptococcus thermophilus* en proteínas de suero de leche (SSt) y caseína (CSt).

En cada una de las fermentaciones se monitoreó el pH del medio; el crecimiento de *Streptococcus thermophilus* en suero de leche disminuyó de forma más rápida el pH: a las 15 hr se encuentra ya por debajo de 4.5. Este mismo cultivo en caseínas tarda en disminuir el pH hasta este punto 21 hr. El crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota en suero de leche tuvo un comportamiento similar al de *Streptococcus thermophilus* en caseínas. El cultivo de *Lactobacillus casei* Shirota en caseínas es el que más tarda en acidificar el medio, llegando por debajo de 4.5 hasta el final de la fermentación. A pesar de estas diferencias en el comportamiento de los cuatro cultivos, a las 42 hr el pH del medio en los cuatro casos está por debajo de 4.5. Ambos microorganismos disminuyen el pH del medio con suero de leche más rápido que en el medio con caseínas. Esto puede ser debido a características como amortiguadores de las caseína.

Proteólisis durante la fermentación

Se cuantificaron los grupos amino libres para estimar la proteólisis producida durante la fermentación. Se observó un aumento significativo de los grupos amino libres al final de la fermentación en el medio de suero de leche de ambas bacterias y en caseínas con *Streptococcus thermophilus* (figura 11); la mayor proteólisis se produjo en la fermentación en suero de leche con *Lactobacillus casei* Shirota con un aumento de 0.56 mg /mL. En el caso de *Lactobacillus casei* Shirota en caseínas no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los tiempos analizados.

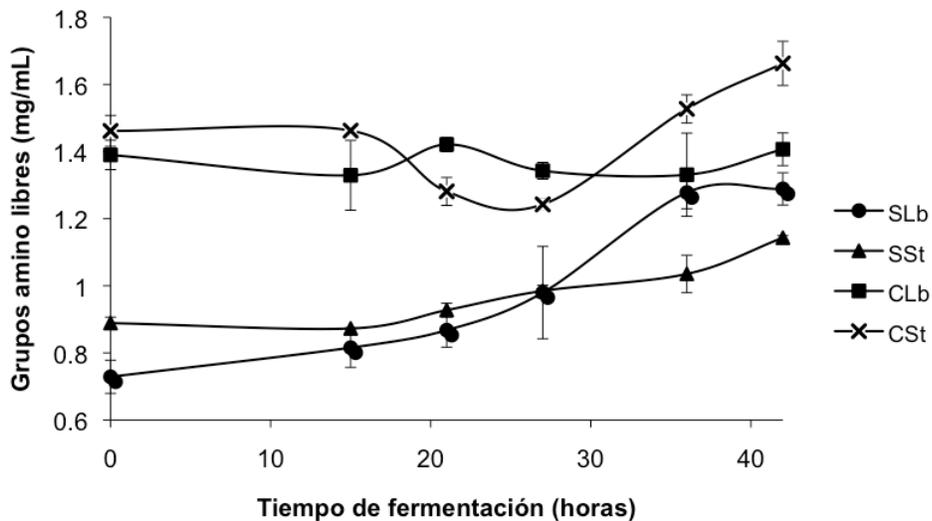


Figura 11. Grupos amino libres durante las fermentaciones: *Lactobacillus casei* Shirota en proteínas de suero de leche (SLb) y caseína (CLb) y *Streptococcus thermophilus* en proteínas de suero de leche (SSt) y caseína (CSt).

Se esperaba un comportamiento similar al del crecimiento de la bacteria con una curva pronunciada, aunque este no se obtuvo si se logro observar un aumento de grupos amino. El tiempo en el que se da el aumento puede ser un indicador de que muestras podrían obtener una mayor concentración y variedad de péptidos de forma que probablemente presentarían una mayor bioactividad, este tipo de comportamiento ya ha sido reportado y estudiado con diferentes bacterias ácido lácticas (Gobbetti y col., 2000; Matar y col., 1996, Yamamoto y col., 1999).

Actividad antihipertensiva

Inhibición de la ACE durante la fermentación

A las muestras de las fermentaciones se les evaluó su capacidad para inhibir la ACE; en la figura 12 se muestran los resultados para las cuatro fermentaciones en suero de leche y caseínas con *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*.

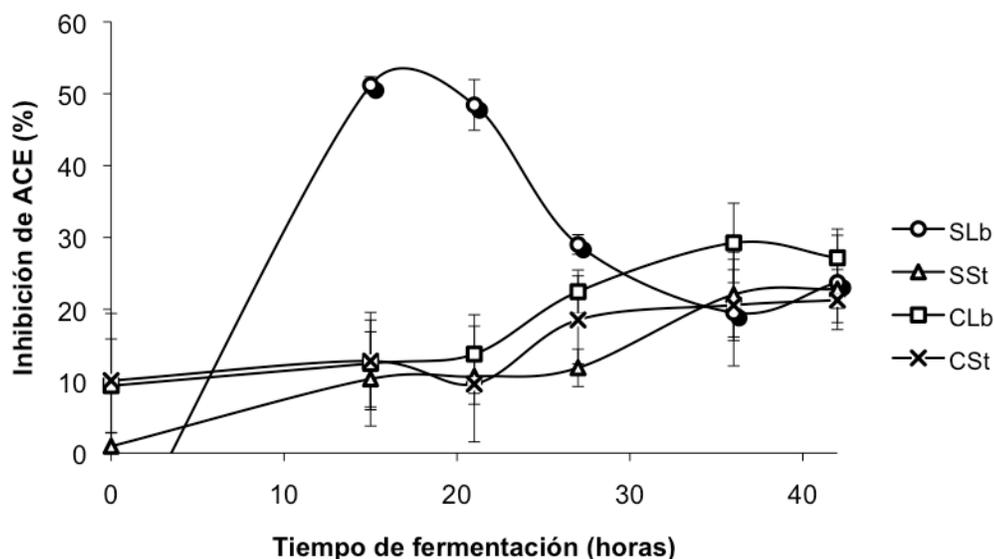


Figura 12. Capacidad de inhibir de la ACE de las muestras tomadas durante las fermentaciones: *Lactobacillus casei* Shirota en proteínas de suero de leche (SLb) y caseína (CLb) y *Streptococcus thermophilus* en proteínas de suero de leche (SSSt) y caseína (SSSt).

La mayor actividad inhibitoria observada fue de 51 % de inhibición con *Lactobacillus casei* Shirota a las 15 hr en suero de leche, mientras que en el caso de *Streptococcus thermophilus* sólo se obtuvo el 22 % a las 42 hr también en suero de leche. Debido a que en la fermentación con *Lactobacillus casei* Shirota no existe diferencia significativa ($P > 0.05$) entre el tiempo 15 y 21 hr, se decidió purificar ambos. En el caso de la fermentación con

Streptococcus thermophilus se seleccionó el tiempo de 42 hr, en el cual se encontró la mayor inhibición. En las fermentaciones en caseína, con *Streptococcus thermophilus* se observaron valores menores de la inhibición a lo largo de la fermentación (10%); con *Lactobacillus casei* Shirota aumenta aproximadamente un 15 % hacia el final de la fermentación. Aunque en estas dos fermentaciones existe capacidad de inhibir la ACE, esta no es alta en comparación con la obtenida en las otras fermentaciones, 51% en la fermentación de suero de leche con *Lactobacillus casei* Shirota, y aun más si se compara con actividades presentadas en otras fermentaciones con otros lactobacilos en caseínas: con *Lactobacillus animalis* 85.51 % (Hayes y col., 2007) y con *Lactobacillus helveticus* 71% (Robert y col., 2004). Por lo que sólo se seleccionaron los tiempos antes mencionados de las fermentaciones en suero de leche.

Se ha reportado que la inhibición de ACE corresponde en la mayoría de los casos al aumento de péptidos en el medio debido a la proteólisis durante la fermentación en leche (Gobbetti y col., 2000; Matar y col., 1996, Yamamoto y col., 1999) por lo tanto se esperaba que el aumento observado en la figura 11 en tres de las cuatro fermentaciones (sólo en la fermentación en caseínas con *Lactobacillus casei* Shirota no hubo diferencia significativa), implicara una mayor capacidad de inhibir la ACE (figura 12), sin embargo solo en el caso de *Streptococcus thermophilus* en suero de leche, la diferencia en la actividad inicial y final, aunque pequeña, es significativa (12%). Con *Lactobacillus casei* Shirota se observó el efecto contrario: la mayor inhibición se detectó en las primeras horas de fermentación y la actividad disminuyó un 44% para el final de la fermentación; esto puede deberse al consumo de péptidos por la misma bacteria durante las últimas horas de fermentación (el cultivo apenas esta entrando en la fase estacionaria). Es importante tomar en cuenta también el cambio de pH que sufre el medio a lo largo de la fermentación, la disminución del pH puede afectar de manera significativa las enzimas del sistema proteolítico de dichas bacterias modificando su comportamiento y por lo tanto el perfil de péptidos obtenido, Nielsen y col. (2009) encontraron que para *Lactococcus lactis* la disminución del pH hasta 4.3 incrementaba la inhibición de la ACE, sin embargo para *Lactobacillus helveticus* el descenso del pH a 3.5 afectaba negativamente la actividad inhibitoria.

Inhibición de la ACE de las fracciones peptídicas

Las muestras seleccionadas de las fermentaciones en suero de leche, se analizaron por HPLC con una columna de exclusión molecular para separar y determinar los pesos moleculares de los péptidos presentes. Debido a que no se han reportado péptidos inhibidores de la ACE mayores a 6 kDa, se seleccionaron los péptidos encontrados en las

fracciones menores a esta masa molecular; en la tabla 3 se muestran las masas moleculares de las fracciones encontradas. Se determinó la inhibición específica de la ACE de todas las fracciones obtenidas (tabla 3), los cromatogramas de las muestras seleccionadas se observan en la figura 13.

Tabla 3. Pesos moleculares e inhibición de la ACE de las fracciones de suero de leche obtenidas por exclusión molecular.

Fermentación de la que proviene y tiempo de la muestra	Fracción	Masa molecular (kDa)	Inhibición específica ^a
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota: 15 hr	A2	2.4	1.47 ± 0.05
15 hr	A4	0.8	0.52 ± 0.05
21 hr	B4	2.4	1.27 ± 0.39
21 hr	B5	1.8	0.33 ± 0.10
<i>Streptococcus thermophilus</i> : 42 hr	C5	2.4	0.36 ± 0.17
42 hr	C6	1.8	0.50 ± 0.07
42 hr	C7	1.4	0.41 ± 0.09
42 hr	C10	0.3	1.78 ± 0.45

^aInhibición específica, % inhibición /($\mu\text{g mL}^{-1}$)

Las fracciones obtenidas con mayor actividad inhibitoria presentaron pesos moleculares por debajo de 2.4 kDa (aproximadamente 17 residuos de aminoácidos) (figura 13 y tabla 3); las secuencias más comunes inhibitorias de ACE son normalmente de menor peso molecular, sin embargo, uno de los mecanismos de acción de los péptidos es por inhibición competitiva (Hernández-Ledesma y col., 2003) por lo que péptidos de diversos pesos moleculares, pero con una secuencia de aminoácidos igual en el extremo terminal, pueden presentar inhibición (Otte y col., 2007). Se encontraron también péptidos de pesos moleculares menores, entre 0.8 y 1.8 kDa; péptidos inhibidores de ACE de tamaños similares han sido reportados por varios autores, sobre todo, en aquellos liberados por hidrólisis enzimática (Pihlanto-Leppälä, 2001). La fracción de mayor actividad fue de 0.3 kDa (de 2 a 3 residuos); se han encontrado péptidos como isoleucil-prolil-alanina (IPA) generado de β -lactoglobulina (Abubakar y col., 1998) y fenilalanil-prolina (FP) de seroalbúmina, que inhiben la ACE y presentan también actividad antihipertensiva in vivo en ratones espontáneamente hipertensos (Saito, 2008).

Péptidos bioactivos de suero de leche y caseínas liberados por la actividad proteolítica de *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*

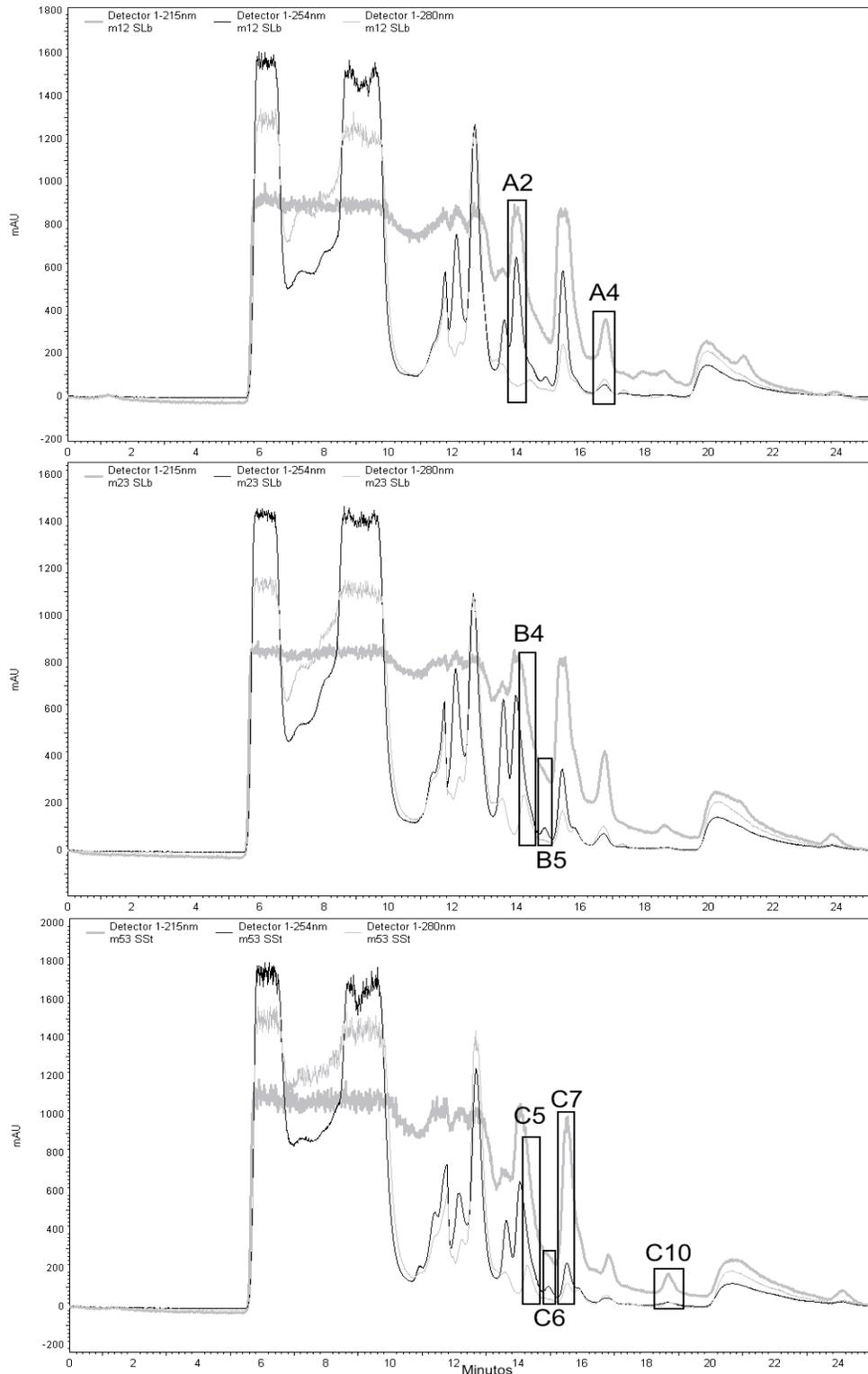


Figura 13. Perfil cromatográfico de las muestras de fermentación con capacidad de inhibir la ACE fraccionadas por exclusión molecular (HPLC), las tres son del medio con proteínas del suero de leche: las dos primeras corresponden a la fermentación con *Lactobacillus casei* Shirota 15 (A) y 21 hr (B) y la última a *Streptococcus thermophilus* 42 hr (C). Las fracciones enmarcadas mostraron capacidad de inhibir la ACE.

Purificación de los péptidos inhibidores de la ACE

Las fracciones seleccionadas por exclusión molecular se purificaron por RP-HPLC; los péptidos encontrados fueron colectados y concentrados para determinar su capacidad de inhibir la ACE. En la figura 14 se observa el cromatograma de la fracción B4.

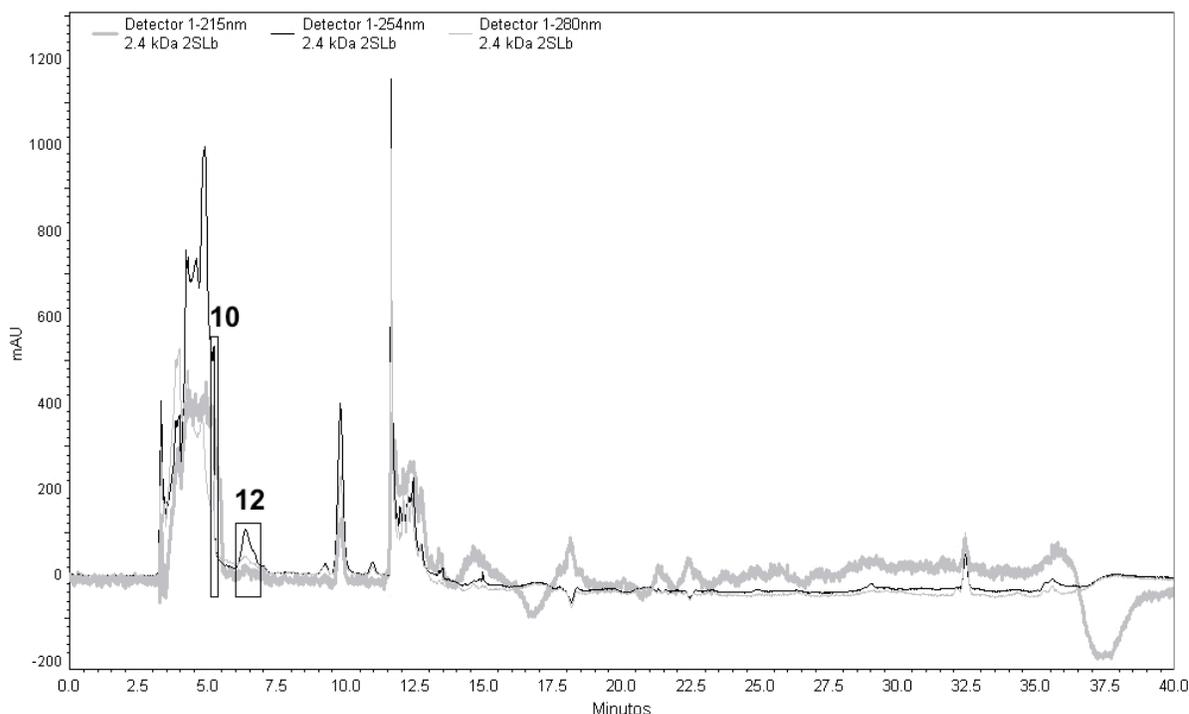


Figura 14. Perfil cromatográfico obtenido por RP-HPLC de la fracción B4 de la fermentación con *Lactobacillus casei* Shirota en proteínas de suero de leche. Se seleccionaron los péptidos 10 y 12 que presentaron capacidad de inhibir la ACE se muestran enmarcados.

Los valores de inhibición específica más altos se encontraron en las muestras fermentadas con *Lactobacillus casei* Shirota: éstos van de 1.1 hasta 3.9 % /($\mu\text{g mL}^{-1}$) (tabla 4). En el caso de *Streptococcus thermophilus* el valor más alto alcanzado fue de 0.95 % /($\mu\text{g mL}^{-1}$), este valor es bajo en comparación al de los péptidos encontrados en las fermentaciones con *Lactobacillus casei* Shirota, por lo que no se seleccionaron péptidos de la fermentación con *Streptococcus thermophilus* para probar su resistencia a la digestión. Se seleccionaron los péptidos de la fermentación con *Lactobacillus casei* Shirota de mayor actividad para probar su resistencia a la digestión: péptido 4 de la fracción A4, 3.85 % /($\mu\text{g mL}^{-1}$); el péptido 10, 1.92 % /($\mu\text{g mL}^{-1}$) y péptido 12 de la fracción B4, 1.90 % /($\mu\text{g mL}^{-1}$) (tabla 4).

Los péptidos purificados de mayor actividad se obtuvieron a partir de la fracción A4 y B4 (tabla 4) como ya se mencionó, aunque estos péptidos presentaron un peso molecular similar (2.4 kD) por los tiempos de retención obtenidos en RP-HPLC podemos notar que son

distintos; el péptido de la fracción A4 eluyó después de la mitad del gradiente (15 min), lo que indica una molécula hidrófoba, mientras que en la fracción B4 (figura 14), los dos péptidos con mayor actividad eluyeron al principio del gradiente, lo que denota una molécula más hidrofílica.

Tabla 4. Inhibición específica de la ACE de los péptidos obtenidos por RP-HPLC. De las muestras de fermentación con proteínas de suero de leche: *Lactobacillus casei* Shirota 15 hr (A), *Lactobacillus casei* Shirota 21hr (B) y *Streptococcus thermophilus* 42 hr (C)

Péptido	Fracción de la que proviene	Tiempo de retención (min)	Inhibición específica ^a
1	A2	9.7	0.46 ± 0.03
2	A2	11.3	0.56 ± 0.12
3	A4	14.6	2.10 ± 0.47
4	A4	14.8	3.85 ± 0.26
5	A4	14.9	2.04 ± 0.32
6	A4	18.0	1.91 ± 0.30
7	B4	4.6	0.05 ± 0.03
8	B4	4.9	0.10 ± 0.01
9	B4	5.2	0.12 ± 0.05
10	B4	5.3	1.92 ± 1.23
11	B4	6.3	0.62 ± 0.12
12	B4	6.7	1.90 ± 0.67
13	B4	12.3	0.40 ± 0.44
14	B4	12.4	0.40 ± 0.00
15	B5	12.2	0.26 ± 0.04
16	B5	12.4	0.23 ± 0.05
17	B5	12.5	0.85 ± 0.45
18	B5	33.1	1.05 ± 0.13
19	C5	11.5	0.40 ± 0.09
20	C6	13.6	0.81 ± 0.02
21	C7	13.2	0.71 ± 0.11
22	C10	12.8	0.48 ± 0.09
23	C10	13.2	0.62 ± 0.15
24	C10	13.8	0.95 ± 0.26

^aInhibición específica, % inhibición /($\mu\text{g mL}^{-1}$)

Existen diversas teorías sobre la composición de los péptidos y su relación con la capacidad de inhibir. Los péptidos con residuos de aminoácidos como la prolina o aminoácidos aromáticos en las tres últimas posiciones del extremo C-terminal, son más efectivos como inhibidores de ACE debido a su carácter hidrófobo (FitzGerald y Meisel, 2000); también se

sabe que aminoácidos con carga positiva como lisina o arginina en el extremo C-terminal contribuyen de forma importante a la capacidad de inhibir (Cheung y col., 1980). Los péptidos purificados generados por la fermentación con *Streptococcus thermophilus* no mostraron valores altos de inhibición; sin embargo, es interesante el hecho de que se genere una actividad inhibitoria significativa, ya que esta bacteria láctica es utilizada en conjunto con otras bacterias lácticas en diversos alimentos, principalmente, con *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* (yogurt). Donkor y col. (2007) han reportado actividades importantes de las muestras de fermentación con dichas bacterias en cultivo mixto; esta actividad se atribuye principalmente a *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus*, sin embargo, cabe la posibilidad de que *Streptococcus thermophilus* genere algún péptido que presente bioactividad durante esta fermentación.

Actividad antitrombótica

Actividad antitrombótica durante la fermentación

Se determinó la actividad antitrombótica de las muestras obtenidas durante las cuatro diferentes fermentaciones. En la figura 15 se muestran los resultados de las fermentaciones.

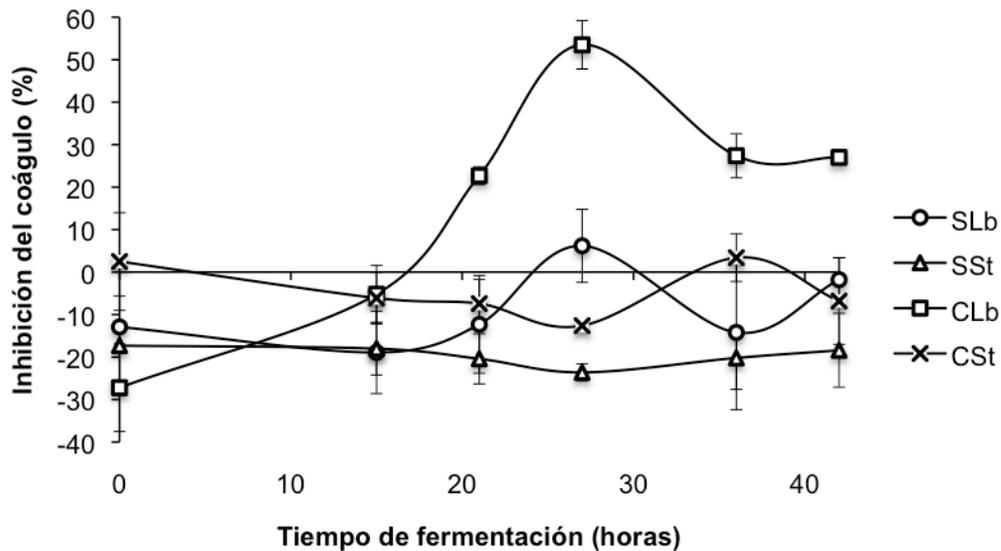


Figura 15. Actividad antitrombótica de las muestras tomadas durante las fermentaciones: *Lactobacillus casei* Shirota en proteínas de suero de leche (SLb) y caseína (CLb) y *Streptococcus thermophilus* en proteínas de suero de leche (SSt) y caseína (CSt).

A las 27 hr de la fermentación con *Lactobacillus casei* Shirota en caseínas se observó la mayor actividad inhibitoria, con 53.5%, solo en esta fermentación se observó actividad

antitrombótica, se seleccionó la muestra de este tiempo y también la de las 36 hr de esta misma fermentación que fue la segunda más alta, para la purificación de los péptidos antitrombóticos.

Si comparamos estos resultados con los obtenidos para los grupos amino libres durante la fermentación (figura 11) y la actividad antitrombótica notamos que a diferencia de las fermentaciones en suero de leche, en la fermentación de caseínas no se observó un aumento de grupos amino libres, que nos indicaría una mayor posibilidad de tener péptidos con actividad antitrombótica, en algún tiempo de fermentación específico; en la fermentación con caseínas con *Streptococcus thermophilus*, no se encontró actividad antitrombótica, sólo se observa actividad inhibitoria en la fermentación en caseínas por *Lactobacillus casei* Shirota (figura 15), esto concuerda con la literatura, en la que sólo se señalan péptidos antitrombóticos generados a partir de caseínas y no de las proteínas del suero de leche bovina (Clare y Swaisgood, 2000; Silva y Malcata, 2005).

Actividad antitrombótica de las fracciones peptídicas

Las dos muestras seleccionadas (27 y 36 hr de la fermentación de *Lactobacillus casei* Shirota en caseínas) de la fermentación de caseínas por *Lactobacillus casei* Shirota, se analizaron por HPLC con una columna de exclusión molecular para separar y determinar los pesos moleculares de los péptidos presentes (figura 16). Se realizó una separación de las fracciones de menos de 6 kDa; en la tabla 5 se pueden observar las masas moleculares de las muestras que presentaron actividad antitrombótica.

Las fracciones D1, D2, D3, D5, D7, E1, E2, E3, E4 y E6 no presentaron actividad inhibitoria y por esto no se presentan en la tabla 5 ni en la figura 16. La mayor inhibición específica obtenida de las 27 hr de fermentación fue de la fracción D9, de 0.7 kDa, con 1.4 %/($\mu\text{g mL}^{-1}$). En el caso del tiempo de fermentación 36 hr la mayor inhibición fue de 1 %/($\mu\text{g mL}^{-1}$), de la fracción E10 también de 0.7 kDa. Estas dos fracciones se seleccionaron para su posterior purificación por RP-HPLC, además de las fracciones D6, D8, E5, E7, E8 y E9.

Los pesos moleculares de los péptidos antitrombóticos derivados de proteínas de la leche, el KRDS de 0.55 kDa de la lactoferrina humana (Fiat y col., 1993) y el MAIPPKKNQDK de 1.44 kDa de la κ -caseína bovina (Jollès y col., 1986) son similares a los pesos de algunas de las fracciones encontradas: la D8 y D9 de 27 hr y la E9 y E10 de 36 hr (figura 16 y tabla 5). Las fracciones encontradas por exclusión molecular tienen pesos moleculares similares en

los dos tiempos de fermentación tratados y algunos también presentan inhibición similar: E9 de 36 hr y D8 de 27 hr, y E7 de 36 hr y D6 de 27 hr. Debido a ello es posible que se trate de los mismos péptidos presentes en muestras diferentes. Para ello será necesario corroborar su perfil por RP-HPLC el cual debe ser muy similar.

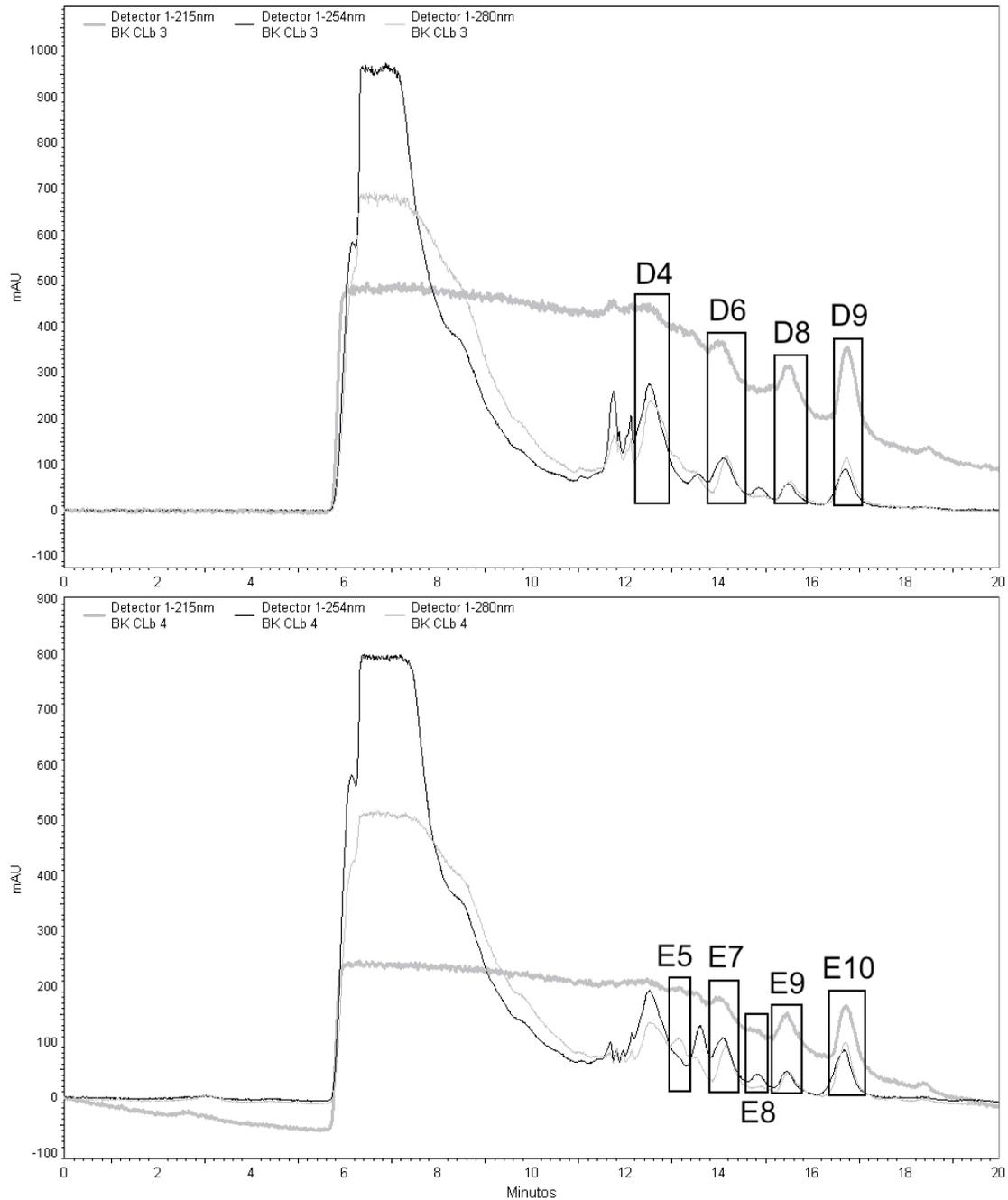


Figura 16. Perfil cromatográfico de las muestras de fermentación con actividad antitrombótica fraccionadas por exclusión molecular (HPLC). Las dos son de la fermentación con *Lactobacillus casei* Shirota en caseínas 27 hr (D) y 36 hr (E). Las fracciones enmarcadas mostraron actividad antitrombótica.

Tabla 5. Pesos moleculares y actividad antitrombótica obtenidas por exclusión molecular de las fracciones de la fermentación con *Lactobacillus casei* Shirota en caseínas

Fermentación de la que proviene y tiempo de la muestra	Fracción	Masa molecular (kDa)	Inhibición específica ^a
27 hr	D4	5.4	0.22 ± 0.07
	D6	2.6	0.73 ± 0.11
	D8	1.3	0.69 ± 0.18
	D9	0.7	1.44 ± 0.02
36 hr	E5	4.1	0.78 ± 0.04
	E7	2.6	0.73 ± 0.04
	E8	1.8	0.92 ± 0.29
	E9	1.4	0.71 ± 0.06
	E10	0.7	1.03 ± 0.05

^aInhibición específica: % inhibición / (µg mL⁻¹)

Purificación de los péptidos antitrombóticos

Las fracciones seleccionadas a partir de exclusión molecular, se purificaron por RP-HPLC; los péptidos encontrados fueron colectados y concentrados para determinar su actividad antitrombótica. En la figura 17 se observa el cromatograma de la fracción E7.

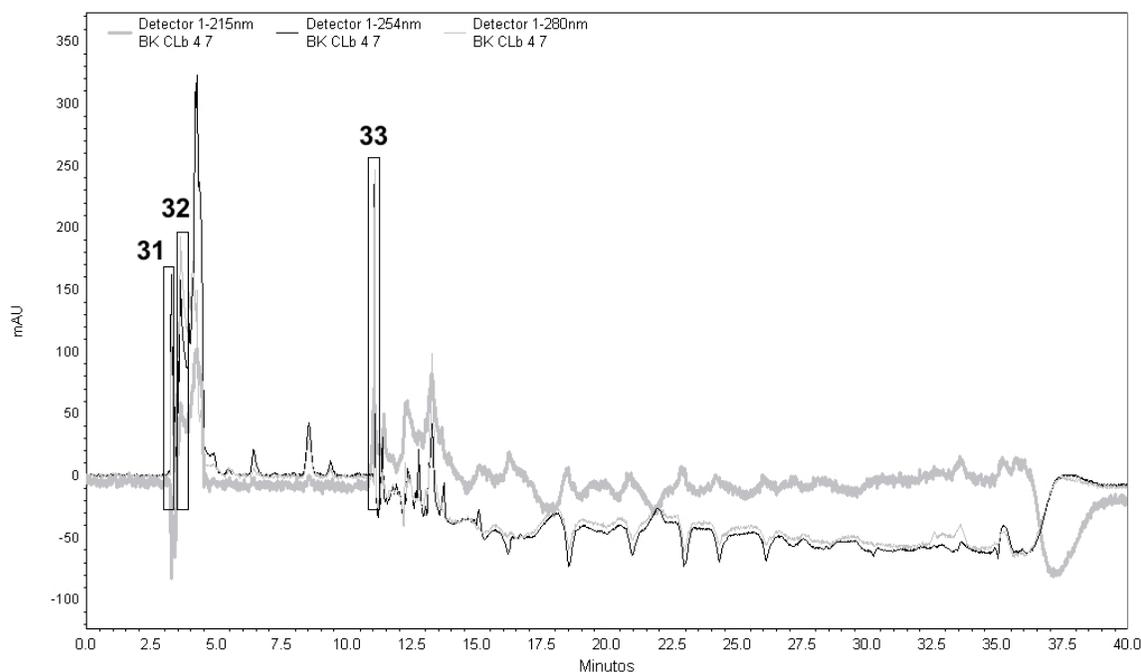


Figura 17. Perfil cromatográfico obtenido por RP-HPLC de la fracción E7 de la fermentación con *Lactobacillus casei* Shirota en caseínas. Los péptidos antitrombóticos que se seleccionaron 31, 32 y 33 se muestran enmarcados.

Los valores de inhibición específica más altos se encontraron en las fracción E7, con un valor de 7.7 % /($\mu\text{g mL}^{-1}$)(figura 17). En la tabla 6 solo se observan los péptidos que presentaron actividad antitrombótica. Las fracciones de pesos moleculares similares de los dos tiempos de fermentación, presentaron péptidos con tiempos de retención similares (Tabla 6), es decir polaridad similar, lo que muy posiblemente significa que pueden ser péptidos con secuencias iguales o muy parecidas,; los péptidos con tiempo de retención 3.6 y 3.3 min pertenecen a fracciones de 2.6 kDa (tabla 6) y los péptidos de 16.1 y 12.3 min de 1.3 y 1.4 kDa respectivamente.

Se seleccionaron todos los péptidos con actividad antitrombótica para probar su resistencia a enzimas digestivas y su posterior secuenciación, dado lo poco común de los péptidos antitrombóticos (Péptidos 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 y 34; tabla 6).

Tabla 6. Actividad antitrombótica de los péptidos obtenidos por RP-HPLC. De las muestras de fermentación con *Lactobacillus casei* Shirota en caseínas 27 hr (D) y 36 hr (E).

Péptido	Fracción de la que proviene ^a	Tiempo de retención (min)	Inhibición específica ^b
25	D6 (2.6 kDa)	3.6	3.8 \pm 0.49
26	D6 (2.6kDa)	5.1	4.1 \pm 0.27
27	D8 (1.3 kDa)	16.1	3.7 \pm 1.00
28	E5 (4.1 kDa)	3.5	4.8 \pm 1.01
29	E5 (4.1 kDa)	4.9	3.1 \pm 1.75
30	E5 (4.1 kDa)	17.5	2.1 \pm 0.48
31	E7 (2.6 kDa)	3.3	6.6 \pm 0.28
32	E7 (2.6 kDa)	4.3	7.7 \pm 0.30
33	E7 (2.6 kDa)	11.0	6.6 \pm 2.49
34	E9 (1.4 kDa)	12.3	4.6 \pm 2.40

^a La masa molar de las fracciones se muestra entre parentesis)

^bInhibición específica: % inhibición /($\mu\text{g mL}^{-1}$)

Resistencia de los péptidos inhibidores de la ACE y antitrombóticos a la digestión gástrica simulada

Se realizó la simulación de digestión gástrica de los péptidos purificados por RP-HPLC. Esta prueba nos permite señalar la posible actividad *in vivo* de los péptidos. Los resultados de esta prueba se encuentran en la tabla 7; los péptidos que resistieron la digestión o que mantuvieron o aumentaron la inhibición de la ACE y la actividad antitrombótica después de la digestión, fueron seleccionados para su identificación: 10, 12, 29, 30, 32, 33 y 34.

Tabla 7. Comportamiento de los péptidos sometidos a la digestión con enzimas gástricas.

Bioactividad	Fermentación	Péptido	IE ^a	Resultado digestión ^b	IE después de la digestión
Inhibición de la ACE	<i>Lb. casei</i> en suero de leche	4	3.9	(+)	0.8
		10	1.9	(+)	1.0, 0.8 ^c
		12	1.9	(-)	1.9
Antitrombótico	<i>Lb. casei</i> en caseínas	25	3.8	(+)	-6.2
		27	1.0	(+)	-3.5
		28	4.8	(+)	1.5
		29	3.1	(+)	2.3, -1.5 ^c
		30	2.1	(+)	1.5
		32	7.7	(+)	7.6
		33	0.3	(+)	1.1
		34	4.6	(+)	4.6

^a Inhibición específica, % inhibición /($\mu\text{g mL}^{-1}$)

^b Hidrolizado: (+), no hidrolizados (-).

^c En estos casos se observaron dos picos durante el análisis y se lograron separar RP-HPLC; se muestra la bioactividad de cada uno. (en el resto se muestra la actividad del hidrolizado completo).

Las barreras que tiene que pasar un péptido bioactivo para ejercer efecto en el tejido u órgano adecuado son diversas (López-Fandiño y col., 2006). Como primer paso esta la resistencia a la digestión gastrointestinal, enseguida debe poder ser absorbido en el intestino para llegar al flujo sanguíneo y por último debe ser estable en el flujo sanguíneo, resistir a la hidrólisis por peptidasas del plasma y ser también, en este caso, resistente a la hidrólisis por la misma ACE (Vermeirssen y col., 2004). Una forma de garantizar que los péptidos tengan efecto *in vivo* es probar su resistencia a las enzimas gástricas (Hernández-Ledesma y col., 2004, Vermeirssen y col., 2003).

En el caso de los péptidos inhibidores de la ACE el péptido 12 fue el único que resistió la hidrólisis. Los péptidos 4 y 10 se digirieron, el primero presentaba antes de la digestión una alta capacidad de inhibir la ACE, que se ve muy disminuida por la digestión, la inhibición de el hidrolizado resultante es casi cinco veces menor; en el caso del péptido 10 también se perdió actividad por la digestión, sin embargo es importante observar la generación de al menos dos fragmentos con capacidad de inhibir la ACE, ambos con la mitad de la actividad del péptido original. Por lo que los péptidos 10 y 12 fueron analizados por medio de espectrometría de masas para identificar su secuencia de aminoácidos. Para los péptidos antitrombóticos: los péptidos 29, 30, 32 33 y 34 al ser hidrolizados liberaron fragmentos que

mantienen o aumentan su actividad inhibitoria. Estos péptidos seguirán presentando la actividad biológica al ser ingeridos y degradados durante la digestión.

Identificación por espectrometría (MALDI-TOF) de péptidos bioactivos

Se identificó la secuencia de los péptidos seleccionados, ésta se encuentra en la tabla 8. Se encontró un péptido derivado de la β -caseína, presente en dos muestras (30 y 34) con actividad antitrombótica. El resto se identificaron como péptidos generados a partir de proteínas constitutivas de *Lactobacillus casei*, esto de acuerdo al análisis BLAST realizado a las secuencias obtenidas; los resultados de dicho análisis arrojan dos valores: Score y E, estos son indicadores de las similitudes de la secuencia estudiada y la posible secuencia original.

Secuencia de los péptidos inhibidores de la ACE

La relación estructura-actividad ha sido estudiada desde hace varias décadas, desde la descripción de los primeros péptidos inhibidores de la ACE encontrados en veneno de serpiente (Cheung y Cushman, 1973). Los péptidos derivados de la caseína con mayor actividad antihipertensiva son los tripéptidos VPP e IPP, sin embargo en comparación con los fármacos análogos de los péptidos inhibidores como el captopril o el enalapril, presentan una baja actividad, esto es debido a la interacción entre éstos y el sitio activo con la ACE, estos fármacos fueron diseñados para acoplarse completamente con el sitio activo de la enzima (Cheung y col., 1980). Pripp en 2004 encontró la relación entre la inhibición de la ACE y la presencia en el extremo C-terminal de un aminoácido hidrofóbico o con carga positiva, y el tamaño del aminoácido adyacente a este extremo, conteniendo hasta seis residuos de aminoácidos; para péptidos más largos esta relación disminuye, y no existe ninguna relación de actividad con el extremo N-terminal. En el caso del péptido 10, inhibidor de la ACE, éste aunque es un péptido de 10 residuos si presenta en el extremo C-terminal aminoácidos hidrofóbicos (Prolina, Valina). Sin embargo, el péptido 12 de 8 residuos, presenta aminoácidos de diferentes características (Asparagina, Treonina); se ha postulado también que el mecanismo de inhibición de la ACE puede involucrar la interacción del inhibidor con subsitios no ocupados normalmente por el sustrato o con un sitio aniónico de unión del inhibidor diferente al sitio catalítico de la enzima (Meisel, 1997), lo que explicaría que se tenga reportes de péptidos inhibidores de la ACE de hasta 27 residuos de

aminoácidos (López-Fandiño y col., 2006), ya que los péptidos de secuencias cortas tienen la capacidad de interactuar con el sitio catalítico de la ACE, sin embargo los péptidos de gran tamaño son incapaces de presentar dicha interacción (impedimento estérico).

Tabla 8. Secuencia de aminoácidos de los péptidos bioactivos seleccionados.

Péptido	Fermentación ^a	Bioactividad	I. E. ^b	Secuencia ^c	Conf ^d	BLAST ^e	Score ^f	E ^g	Origen
10	Lb-S, 21 hrs	I. ACE	4	SKLRHKNSPV	70	SKLRHFLKVNSP	22.3	0.077	Fago integrasa
12	Lb-S, 21 hrs	I.ACE	2	NVSNNHNT	28	VSNNH	19.3	0.061	Transportadora L-Asp
29	Lb-C, 36 hrs	Antitromb.	3.1	NVSNNHNT	28	VSNNH	19.3	0.061	Transportadora L-Asp
30	Lb-C, 36 hrs	Antitromb.	2.1	YQEPVLGPVRGPFPIIV	99	YQEPVLGPVRGPFPIIV	58.7	3x10 ⁻¹⁵	Beta caseína
32	Lb-C, 36 hrs	Antitromb.	7.7	SNNSNSNY	1	NNSNWNGNY	18.0	0.13	Proteína de superficie de la célula
33	Lb-C, 36 hrs	Antitromb.	0.3	ISNHNSVPVAL	25	SVPVAL	20.6	0.16	ATPasa transportadora de cationes
34	Lb-C, 36 hrs	Antitromb.	4.6	YQEPVLGPVRGPFPIIV	99	YQEPVLGPVRGPFPIIV	58.7	3x10 ⁻¹⁵	Beta caseína

^a Fermentación durante la cual se obtuvo; Lb = *Lactobacillus casei* Shirota, S = suero de leche, C = caseína,

^b Inhibición específica: %inhibición / ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

^c Secuencias obtenidas en el INMEGEN, en algunos casos se obtuvieron varias posibles.

^d % de confiabilidad de la secuencia identificada por MALDI-TOF.

^e Secuencias que mejor coincidieron según el BLAST.

^f Puntuación dada según el número y posición de los alineamientos idénticos encontrados.

^g El valor E es un parámetro que describe el número de secuencias que se puede esperar ver por casualidad, al buscar una base de datos de un tamaño determinado. Que disminuye exponencialmente a medida que la puntuación (Score) aumenta.

Secuencia de los péptidos antitrombóticos

Las secuencias de los péptidos purificados por RP-HPLC e identificados por espectrometría de masas (tabla 8), es diferente a las secuencias reportadas anteriormente, esto se explica debido a que la actividad antitrombótica exhibida por los péptidos encontrados en este trabajo, se da mediante la inhibición de la acción de la trombina sobre el fibrinógeno, mientras que en el caso de la casoplatelina y el péptido KRDS, la actividad antitrombótica se

da por inhibición de la unión de éstas al fibrinógeno o de la agregación de la plaquetas respectivamente. La trombina tiene varios dominios, el sitio catalítico y dos sitios de unión complementarios, llamados exositos, que sirven para regular las interacciones de la trombina con varios sustratos biológicos (Adams y Huntington, 2006). La conversión del fibrinógeno a fibrina por medio de la trombina depende de su unión a un exosito (Kelly y col., 1992). De manera que los péptidos inhibidores de la trombina encontrados pueden actuar de maneras diferentes, obstruyendo el sitio activo o un exosito o ambos (Koh y Kini, 2009). El péptido YQEPVLGPVRGPFPIIV (péptido 30 y 34) es un péptido comúnmente liberado durante la fermentación de leche; éste ha sido reportado como péptido bioactivo, exhibiendo otras actividades como antihipertensivo (Robert y col., 2004), antimicrobiano (Sandre y col., 2001) e inmunomodulador (Migliore-Samour y col. 1989). La actividad antihipertensiva fue confirmada con una inhibición específica de $0.3 \text{ \%}/(\mu\text{g mL}^{-1})$. Péptidos, como éste, son denominados multifuncionales y han sido reportados anteriormente con otras bioactividades (Meisel, 2004). También es importante mencionar que el péptido NVSNNHNT (péptido 12), inhibidor de ACE presenta la misma secuencia del péptido 29 (inhibidor de la trombina) es decir también dicho péptido parece ser multifuncional.

Péptidos bioactivos liberados de las proteínas de la pared celular de *Lactobacillus casei*

Aunque en nuestra idea original y antecedentes estudiados, se presentó la posibilidad de que todos los péptidos que se encontrarían serían originados únicamente por las proteínas de la leche, solo dos péptidos presentaron origen en la β -caseína, con la misma secuencia (YQEPVLGPVRGPFPIIV). El resto de los péptidos identificados tienen origen en proteínas constitutivas de *Lactobacillus casei*. Esto puede explicarse por la actividad proteolítica de la célula; las bacterias ácido lácticas comúnmente tienen sistema de autolisinas, de esta forma se da la maduración de los quesos (Lortal y col., 1997). Knox y Brandsen en 1962 encontraron que algunas cepas de *Lactobacillus casei*, tienen sistema de enzimas autolíticas, que liberan fragmentos solubles de la pared celular al medio, la autólisis se puede dar durante la etapa exponencial, aunque se da mayormente en la fase estacionaria sin embargo actividad autolítica se ve ampliamente influenciada por el pH y la temperatura (Kang y col., 1998).

El origen de las secuencias encontradas es variado; aunque la mayoría son proteínas presentes en la pared celular, el péptido 10 (SKLRHKNSPV) se originó de una fago

integradas; estas enzimas recombinan dos cadenas de ADN en un sitio específico; generalmente se pueden encontrar genes de estas enzimas en bacterias ácido lácticas (Brüssow, 2001). El péptido 12 y 29 (NVSNNHNT) que fue generado durante dos fermentaciones distintas es parte de la secuencia de una transportadora de L-aspartato; *Lactobacillus casei* transporta aspartato rápidamente ya que este aminoácido es esencial para su crecimiento (Strobel y col., 1989). El péptido 32 (SNNSNSNY), proviene de una proteína de superficie, presenta un dominio conservado, una señal en el extremo N-terminal, que tiende a presentarse en proteínas largas de la familia firmicutes a la cuál pertenecen las bacterias ácido lácticas. El péptido 33 (ISNHNSVPVAL), es parte de la secuencia de una ATPasa transportadora de cationes; Mileykovskaya y col. en 1987, describieron estas enzimas en *Lactobacillus casei*, las cuales son necesarias para generar la fuerza protón-motriz. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos bioactivos de origen bacteriano y su bioactividad no han sido reportadas, por lo que más estudios sobre su generación son necesarios.

Conclusiones

La producción de péptidos bioactivos durante las fermentaciones fue específica para cada especie. *Lactobacillus casei* Shirota tuvo una mayor capacidad proteolítica, generó una mayor cantidad de péptidos inhibidores de la ACE y de mayor potencia que *Streptococcus thermophilus*. Sólo a partir de la fermentación de caseínas por *Lactobacillus casei* Shirota se obtuvieron péptidos antitrombóticos y de acuerdo a la masa molecular y la secuencia de los péptidos encontrados, podemos decir que estos no han sido descritos anteriormente como inhibidores de la trombina. Dos de los péptidos inhibidores de la ACE identificados, resistieron o mantuvieron su actividad frente a la acción de enzimas gástricas; los cinco péptidos inhibidores de la trombina identificados mantuvieron o aumentaron su actividad inhibidora tras la acción de las enzimas digestivas en condiciones biológicas simuladas. Esto indica la posible actividad *in vivo* de estos péptidos.

Al inicio de este trabajo se esperaba encontrar nuevos péptidos bioactivos derivados de las proteínas de suero de leche, sin embargo la producción de péptidos con actividades multifuncionales (inhibidores de ACE y antitrombóticos), le dieron un giro al trabajo, sin duda la presencia de péptidos con origen en proteínas constitutivas de *Lactobacillus casei* también fue un resultado inesperado; estos abren muchas posibilidades a la investigación de los péptidos bioactivos.

Referencias

- Abubakar, A. Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh, T. 1998. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *Journal of Dairy Science*, 81, 3131-3138.
- Adams, T. E., Huntington, J. A. 2006. Thrombin-cofactor interactions: structural insights into regulatory mechanisms. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 26, 1738-1745.
- Ahn, J. E., Park, S. Y., Atwal, A., Gibbs, B. F., Lee, B. H. 2009. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey fermented by *Lactobacillus* species. *Journal of Food Biochemistry*, 33, 587-602.
- Aimutis, W. R. 2004. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticarcinogenesis. *Journal of Nutrition*, 134(4), 989S-995S.
- Bouhallab, S., Bouglé, D. 2004. Biopeptides of milk: Caseinophosphopeptides and mineral bioavailability. *Reproduction, Nutrition and Development*, 44, 493-498.
- Brussow, H. 2001. Phages of dairy bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55, 283-303
- Calhoun, D. A., Jones, D., Textor, S., Goff, D. C., Murphy, T. P., Toto, R. D., White, A., Cushman, W. C., White, W., Sica, D., Ferdinand, K., Giles, T. D., Falkner, B., Carey, R. M. 2008. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment. A scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension*, 51 (6) 1403-1419
- Chen, G. W., Tsai, J. S., Pan, B. S. 2007. Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation. *International Dairy Journal*, 17(6), 641-647.
- Cheung, H. S., Cushman, D. W. 1973. Inhibition of homogeneous angiotensin-converting enzyme of rabbit lung by synthetic venom peptides of *Bothrops jararaca*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 293(2), 451-463.
- Cheung, H. S., Feng Lai, W., Ondetti, M. A., Sabo, E. F., Cushman, D. W. 1980. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting-enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 255, 401-407.
- Chobanian A. V., Bakris, G. L., Black, H. R., Cushman, W.C., Green, L. A., Izzo, J. L., Jones, D. W. Jr., Materson, B. J., Oparil, S., Wright, J. T., Roccella, E. J. Jr., 2003. The National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*, 42(6), 1206-1252.
- Ciprandi, A., Kobe de Oliveira, S., Masuda, A., Horn, F., Termignoni, C. 2006. *Boophilus microplus*: its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. *Experimental Parasitology*, 114(1), 40-46
- Clare, D. A., Swaisgood, H. E. 2000. Bioactive milk peptides: A prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83, 1187-1195.
- Clare, D. A., Catignani, G. L., Swaisgood, H. E. 2003. Biodefense properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1239-1255.
- Cushman, D. W., Cheung, H. S. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20, 1637-1648.
- Doeven, M. K., Kok, J., Poolman, B. 2005. Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Molecular Microbiology*, 57(3), 640-649.
- Donkor, O. N., Henriksson, A., Singh, T. K., Vasiljevic, T., Shah, N. P. 2007. ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*, 17, 1321-1331.

- Dziuba, M., Darewicz, M. 2007. Food Proteins as Precursors of Bioactive Peptides-Classification Into Families. *Food Science and Technology International*, 13(6), 393-404.
- Ebringer, L., Ferenčík, M., Krajčovič, J. 2008. Beneficial health effects of milk and fermented dairy products, review. *Folia Microbiologica* 53(5), 378-394.
- Erdmann, K., Cheung, K. W. Y., Schröder, H. 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(10), 643-654.
- Fernandez-Espla M. D., Garault, P., Monnet, V., Rul, F. 2000. *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11), 4772-4778.
- Fiat, A. M., Levy-Toledano, S., Caen, J. P., Jollits, P. 1989. Biologically active peptides of casein and lactotransferrin implicated in platelet function. *Journal of Dairy Research*, 56, 351-355.
- Fiat, A.M., Migliore-Samour, D., Jollès, P., Drouet, L., Sollier, C.B.D., Caen, J. 1993. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *Journal of Dairy Science*, 76, 301-310.
- FitzGerald, R. J., Meisel, H. 2000. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I converting enzyme. *British Journal of Nutrition*, 84, S33-S37.
- FitzGerald, R. J., Murray, B. A., Walsh, D. J. 2004. Hypotensive peptides from milk proteins. *Journal of Nutrition*, 134, 980S-988S.
- FitzGerald, R. J., Murray, B. A. 2006. Bioactive peptides and lactic fermentations. *Society of Dairy Technology*, 59(2), 118-125.
- Fox, P. F. 2001. Milk proteins as food ingredients. *International Journal of Dairy Technology*, 54(2), 41-55.
- Freedman, R. B., Radda, G. K. 1968. The reaction of 2, 4, 6 trinitrobenzenesulphonic acid with amino acids, peptides and proteins. *Biochemistry Journal*, 108, 383-391.
- Fuglsang, A., Nilsson, D., Nyborg, N. C. B. 2002. Cardiovascular effects of fermented milk containing angiotensin-converting enzyme inhibitors evaluated in permanently catheterized, spontaneously hypertensive rats. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3566-3569.
- Fuglsang, A., Rattray, F. P., Nilsson, D., Nyborg, N. C. B. 2003. Lactic acid bacteria: Inhibition of angiotensin converting enzyme *in vitro* and *in vivo*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83, 27-34.
- Gailani, D., Renné, T. 2007. Intrinsic pathway of coagulation and arterial thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(12), 2507-2513.
- Ganapathy, V., Leibach, F. H. 1999. Protein digestion and assimilation. En Yamada, T. (ed.), *Textbook of Gastroenterology*. p. 456-467. Lippincott Williams y Wilkins. Philadelphia, E.U.A.
- Garault, P., Le Bars, D., Besset, C., Monnet, V. 2002. Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. *The Journal of biological chemistry*, 277, 32-39.
- Gauthier, S. F., Pouliot, Y. 2003. Functional and biological properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 86, E78-E87.
- Gilbert, C., Blanc, B., Frot-Coutaz, J., Portalier, R., Atlan, D. 1997. Comparison of cell surface proteinase activities within the *Lactobacillus* genus. *Journal of Dairy Research*, 64(4), 561-571.
- Gill, H. S., Doull, F., Rutherford, K. J., Cross, M. L. 2000. Immunoregulatory peptides in bovine milk. *British Journal of Nutrition*, 84, S111-S117.
- Gobbetti, M. 1999. *Lactobacillus/Lactobacillus casei*. En Robinson, R., Batt, C., Patel, P. (ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. p. 1157-1164. Elsevier Science. Londres, Reino Unido.

- Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F., Addeo, F. 2000. Production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3898-3904.
- Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A., Cagno, R. D. 2002. Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 223-239.
- Gobbetti, M., Minervini, F., Rizzello, C. G. 2004. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 172-188.
- Hartmann, R., Meisel, H. 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 163-169.
- Hayakari, M., Kondo, Y., Izumi, H. 1978. A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Analytical Biochemistry*, 84, 361-369.
- Hayes, M., Stanton, C., Slattery, H., O'Sullivan, O., Hill, C., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. 2007. Casein fermentate of *Lactobacillus animalis* DPC6134 contains a range of novel propeptide angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4658-4667.
- Hernández-Ledesma, B., Martín-Álvarez, P. J., Pueyo, E. 2003. Assessment of the spectrophotometric method for determination of angiotensin-converting-enzyme activity: influence of the inhibition type. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4175-4179.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., 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(6), 1504-1510.
- Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., Decaris, B., Bolotin, A., Delorme, C., Ehrlich, S. D., Guédon, E., Monnet, V., Renault, P., Kleerebezem, M. 2005. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 435-463.
- Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W., Chi, L. 2008. The antihypertensive effect of peptides: a novel alternative to drugs?. *Peptides*, 29(6), 1062-1071.
- Iyer, R., Tomar, S. K., Maheswari, T. U., Singh, R. 2010. *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 20(3), 133-141.
- Jesse, F., Choil, S. Y. 1970. Quantification of protein solutions with trinitrobenzensulfonic acid. *Clinical Chemistry*, 16, 24-31.
- Jollès, P., Levy-Toledano, S., Fiat, A. M., Soria, C., Gillessen, D., Thomaidis, A., Dunn, F. W., Caen, J. P. 1986. Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from kappa-casein on platelet function. *European Journal of Biochemistry*, 158, 379-382.
- Juille, O., Le Bars, D., Juillard, V. 2005. The specificity of oligopeptide transport by *Streptococcus thermophilus* resembles that of *Lactococcus lactis* and not that of pathogenic streptococci. *Microbiology*, 151, 1987-1994.
- Kang, O. J., Vézin, L. P., Laberge, S., Simard, R. E. 1998. Some factors influencing the autolysis of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei*. *Journal of Dairy Science*, 81(3), 639-646.
- Kelly, A. B., Maraganore, J. M., Bourdon, P., Hanson, S. R., Harker, L. A. 1992. Antithrombotic effects of synthetic peptides targeting various functional domains of thrombin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 89, 6040-6044.
- Kim, Y. E., Yoon, S., Yu, D. Y., Lønnerdal, B., Chung, B. H. 1999. Novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human α 1-casein expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Dairy Research*, 66, 431-439.

- Kitts, D. D., Weiler, K. A. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources: applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1309–1323.
- Kitts, D. D. 2005. Antioxidant properties of casein-phosphopeptides. *Trends in Food Science and Technology*, 16(12) 549-554.
- Knipping G., Rotheneder, M., Strieg, J. G., Esterbaue, H. 1990. Antioxidants and resistance against oxidation of porcine LDL subfractions. *Journal of Lipid Research*, 31(11), 1965-1972.
- Knox, K. W., Brandsen, J. 1962. The isolation of components from the cell wall of *Lactobacillus casei*. *The Biochemical Journal*, 85, 15-23.
- Koh, C. Y., Kini, R. M. 2009. Molecular diversity of anticoagulants from haematophagous animals. *Thrombosis and Haemostasis*, 102, 437-453.
- Kojic, M., Fira, D., Banina, A., Topisirovic, L. 1991. Characterization of the cell wall-bound proteinase of *Lactobacillus casei* HN14. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1753-1757.
- Korhonen, H., Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960.
- Korhonen, H. 2009. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 177-187.
- Kunji E. R. S, Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., Konings, W. N. 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70(2), 187-221.
- Kunji E. R. S., Fang G., Jeronimus-Stratingh, C. M., Bruins, A.P., Poolman, B., Konings, W. N. 1998. Reconstruction of the proteolytic pathway for use of beta-casein by *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*, 27(6), 1107-1118.
- Lane, D. A., Philippou, H., Huntington, J. A. 2005. Directing thrombin. *Blood*, 106(8) 2605-2612.
- Letort, C., Juillard, V. 2001. Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1023-1029.
- López-Expósito, I., Recio, I. 2006. Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16, 1294-1305.
- López-Fandiño, R., Otte, J., Van Camp, J. 2006. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, 16(11), 1277-1293.
- Lortal, S., Lemée, R., Valence, F. 1997. Autolysis of thermophilic lactobacilli and dairy propionibacteria: a review. *Le Lait*, 77(1), 133-150.
- Macfarlane, R.G. 1948. Normal and abnormal blood coagulation: a review . *The Journal of Clinical Pathology*, 1, 1113-1143.
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., Malcata, F. X. 2007. Bovine whey proteins - overview of their main biological properties. *Food Research International*, 40, 1197-1211.
- Matar, C., Amito, J., Savoie, L., Goulet, J. 1996. The effect of milk fermentation by *Lactobacillus helveticus* on the release of peptides during *in vitro* digestion. *Journal of Dairy Science*, 79, 971-979.
- Matar, C., LeBlanc, J. G., Martin, L., Perdigón, G. 2003. Biologically active peptides released in fermented milk: role and functions. En Farnworth, E. R. (Ed.), Handbook of fermented functional foods. Functional foods and nutraceuticals series. p. 177-201. CRC Press. Florida, USA.
- Meisel, H. 1997. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers*, 43(2), 119-128.
- 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. *Australian Journal of Dairy Technology*, 56, 83-92.
- Meisel, H., FitzGerald, R.J. 2003. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1289-1295.
- Meisel, H. 2004. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *BioFactors*, 21, 55-61.
- Mellanby, J. 1909. The coagulation of blood. Part II. The actions of snake venoms, peptone and leech extract. *The Journal of Physiology*, 38(6) 441-503.
- Migliore-Samour, D., Floc'h, F., Jollès, P. 1989. Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation. *Journal of Dairy Research*, 56, 357-362.
- Miles, A. A., Misra, S. S. 1938. The estimation of bactericidal power of the blood. *Journal of Higiene*, 38, 732-749.
- Mileykovskaya E. I., Abuladze, A. N., Kormer, S. S. Ostrovsky, D. N. 1987. Some peculiarities of functioning of H⁺-ATPase from the membranes of the anaerobic bacterium *Lactobacillus casei*. *European Journal of Biochemistry FEBS*, 167(2), 367-370.
- Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., Schrezenmeir, J. 2008. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47(4), 171-182.
- Monnet, C., Mora, D., Corrieu, G. 2005. Glutamine synthesis is essential for growth of *Streptococcus thermophilus* in milk and is linked to urea catabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 3376-3378.
- Moreira, M., Abraham, A., De Antoni, G. 2000. Technological properties of milks fermented with thermophilic lactic acid bacteria at suboptimal temperature. *Journal of Dairy Science*, 83, 395-400.
- Mullally, M. M., Meisel, H., FitzGerald, R. J. 1997. Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Letters*, 402, 99-101.
- Murray, B. A., FitzGerald, R. J. 2007. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production. *Current Pharmaceutical Design*, 13, 773-791.
- Nagaoka, S., Futamura, Y., Miwa, K., Awano, T., Yamauchi, K., Kanamaru, Y. 2001. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 218, 11-17.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Takano, T. 1995. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Dairy Science*, 78, 1253-1257.
- Nielsen, M. S., Martinussen, T., Flambard, B., Sorensen, 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, 155-165.
- Ohsawa, K., Satsu, H., Ohki, K., Enjoh, M., Takano, T., Shimizu, M. 2008. Producibility and digestibility of antihypertensive beta-casein tripeptides, Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro, in the gastrointestinal tract: analyses using an *in vitro* model of mammalian gastrointestinal digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 854-858.
- Ong, K. L., Cheung, B. M. Y., Man, Y. B., Lau, C. P., Lam, K. S. L. 2007. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension among united states adults 1999-2004. *Hypertension*, 49(1), 69-75
- Otte, J., Shalaby, S. M. A., Zakora, M., Nielsen, S. M. 2007. Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from α -lactalbumin and β -casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. *International Dairy Journal*, 17, 1460-1472.

- Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T., Korhonen, H. 1998. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International Dairy Journal*, 8, 325-331.
- Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T., Korhonen, H. 2000. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research*, 67, 53-64.
- Pihlanto-Leppälä, A. 2001. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends in food science and technology*, 11(9-10), 347-356.
- Pihlanto, A., Korhonen, H. 2003. Bioactive peptides and proteins. *Advances in food and nutrition research*, 47, 175-277.
- Pihlanto, A. 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Internacional Dairy Journal*, 16, 1306-1314.
- 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.
- Pripp, A. H., Isaksson, T., Stepaniak, L., Sorhaug, T. 2004. Quantitative structure-activity relationship modelling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins. *European Food Research and Technology*, 219, 579-583.
- Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L., Recio, I. 2005. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *Journal of Dairy Science*, 88(10), 3480-3487.
- Raha, S., Dosquet, C., Abgrall, J. F., Jollès, P., Fiat, A. M., Caen, J. P. 1988. KRDS a tetrapeptide derived from lactotransferrin-inhibits binding of monoclonal antibody against glycoprotein IIb-IIIa on ADP-stimulated platelets and megakaryocytes. *Blood*, 72, 172-178.
- Rajagopal, S. N., Sandine, W. E. 1990. Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk. *Journal of Dairy Science*, 73, 894-899.
- Robert, M. C., Razaname, A., Mutter, M., 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 Agriculture and Food Chemistry*, 52, 6923-6931.
- Rutherford, K. J., Gill, H. S. 2000. Peptides affecting coagulation. *British Journal of Nutrition*, 84, S99-S102.
- Rul, F., Monnet, V. 1997. Presence of additional peptidases in *Streptococcus thermophilus* CNRZ 302 compared to *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology*, 82(6), 695-704.
- Saito, T., Nakamura, T., Kitzawa, H., Kawai, Y., Itoh, T. 2000. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, 83, 1434-1440.
- Saito, T. 2008. Antihypertensive peptides derived from bovine casein and whey proteins. En Z. Bösze (ed.), *Advances in experimental medicine and biology: Bioactive components of milk*. Vol. 606, p. 295-317. Springer. Newyork, E. U. A.
- Sandre, C., Gleizes, A., Forestier, F., Gorges-Kergot, R., Chilmonczyk, S., Leonil, J., Moreau, M. C., Labarre, C. 2001. A peptide derived from bovine β -casein modulates functional properties of bone marrow-derived macrophages from germ free and human flora-associated mice. *Journal of Nutrition*, 131, 2936-2942.
- Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 394-406.
- Schaden, E., Kozek-Langenecker, S. A. 2010. Direct thrombin inhibitors: pharmacology and application in intensive care medicine. *Intensive Care Medicine*, 36, 1127-1137.

- Schaffer, L. W., Davidson, J. T., Vlasuk, G. P., Siegl, P. K. S. 1991. Antithrombotic efficacy of recombinant tick anticoagulant peptide, a potent inhibitor of coagulation factor Xa in a primate model of arterial thrombosis. *Circulation*, 84, 1741-1748.
- Schrezenmeir, J., Korhonen, H., Williams, M., Gill, H. S., Shah, N. P. 2000. Bioactive substances in milk with properties decreasing risk of cardiovascular diseases. *British Journal of Nutrition*, 84, S155-159.
- Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T., Korpela, R. 2003. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(2), 326-330.
- Séverin, S., Wenshui, X. 2005. Milk biologically active components as nutraceuticals: review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(7), 645-656.
- Shimizu, M. 2004. Food-derived peptides and intestinal functions. *BioFactors*, 21, 43-47.
- Silva, S. V., Malcata, F. X. 2005. Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15(1), 1-15.
- Sipola, M., Finckenberg, P., Korpela, R., Vapaatalo, H., Nurminen, M. L. 2002 Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *Journal of Dairy Research*, 69, 103-111.
- Strobel, H. J., Russell, J. B., Driessen, A. J., Konings, W. N. 1989. Transport of amino acids in *Lactobacillus casei* by proton-motive-force-dependent and non-proton motive-force dependent mechanisms. *Journal of Bacteriology*, 171(1), 280-284.
- Suzuki, S., Hachimori, Y., Yaoeda, U. 1970. Spectrophotometric determination of glycine with 2, 4, 6-trichloro-s-triazine. *Analytical Chemistry*, 42, 101-103.
- Teschemacher, H. 2003. Opioid receptor ligands derived from food proteins. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1331-1344.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., Verstraete, W. 2002. Optimisation and validation of an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 51, 75-87.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., Decroos, K., Van Wijmelbeke, L., Verstraete, W. 2003. The impact of fermentation and in vitro digestion on the formation of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein. *Journal of Dairy Science*, 86(2), 429-438.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., Verstraete, W. 2004. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92(3), 357-366.
- Watanabe, T., Mike, A. 1999. Section 2 taxonomy. En Yakult Central Institute For Microbiological Research (ed.), *Lactobacillus casei* strain Shirota. P. 3-23. Yakult Honsha Co. Ltd. Tokio, Japón.
- Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T. 1994. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science*, 77, 917-922.
- 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, 1388-1393.
- Yamamoto, N., Ejiri, M., Mizuno, S. 2003. Biogenic peptides and their potential use. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1345-1355.
- Yang, C. Y., Dantzig, A. H., Pidgeon, C. 1999. Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. *Pharmaceutical Research*, 16, 1331-1343.
- Yang, W.G., Wang, Z., Xu, S. Y. 2007. A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysate by microplate reader. *Chinese Chemical Letters*, 18, 449-451.

Zhang S. B., Wang, Z., Xu, S. Y. 2008 Antioxidant and antithrombotic activities of rapeseed peptides.
Journal of American Oil Chemists' Society, 85, 521-527.

Zirnstein, G. y Hutkins, R. *Streptococcus/Streptococcus thermophilus*. En Robinson, R., Batt, C., Patel, P. (ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. p. 2127-2133. Elsevier Science. Londres, Reino Unido.

Anexos

Preparación de reactivos

Medio de cultivo

Leche 10%: Se agregaron 15 g de leche a 150 mL de agua destilada, se disolvieron completamente y se esterilizó a 121° C por 15 min.

Caseína 3.5%:

- 5.25 g de caseína (Hammarsten quality, Research Organics; Cleaveland, EUA).
- 7.5 g de lactosa (concentración final de 5%).
- 1.75 g de YCB (Yeast Carbon Base, Difco; Detroit, EUA) (concentración final de 1.17%).

Se agregan 150 mL de agua destilada se diluye por completo subiendo el pH a 7.5 (con hidróxido de sodio 10 N) y posteriormente se calienta a 90° C por 30 min.

Suero de leche 3.5%:

- 10.5 g de WPC 50 (Whey Protein Concentrate, Foremost Whey Products, Baraboo WI, EUA) (5.25 g de proteína de suero de leche).
- 1.75 g de YCB (concentración final de 1.17%).

Se agregan 150 mL de agua destilada se diluye por completo subiendo el pH a 7.5 (con hidróxido de sodio 10 N) y posteriormente se calienta a 60° C por 30 min.

Agar Mann Rogosa Sharpe (MRS): Se agregaron 10.5 g de agar MRS (Difco; Detroit, EUA) a 150 mL de agua se disuelve mientras se calienta hasta que hierve (aproximadamente 10 cajas de petri), se esterilizó a 121° C por 15 min.

Agua peptonada 0.5 %: Se agregan 2.5 g de peptona de caseína a 500 mL de agua, se esterilizo 121° C por 15 min.

Soluciones de la técnica de TNBS

Amortiguador de fosfatos 0.2125 M, pH 8.2:

- 9.2525 g de fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) aforado a 250 mL.
- 1.4460 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) aforado a 50 mL.

Se agrega el fosfato de potasio monobásico al fosfato de potasio dibásico hasta alcanzar el pH de 8.2.

Solución de ácido clorhídrico 0.1 N: 0.970 mL de ácido clorhídrico (HCl) 10.3 N aforado a 100 mL.

Solución de ácido TNBS 0.10 %: 0.05 mL de TNBS (Fluka, Sigma-Aldrich, Suiza), aforado a 50 mL de amortiguador de fosfatos 0.2125 M pH 8.2.

Soluciones para la determinación de ACE

Solución amortiguadora de borato 0.1 M, cloruro de sodio 0.3 M, pH 8.3:

- 61.8 mg de ácido bórico (H_3BO_3).
- 175.3 mg de cloruro de sodio (NaCl).

Se afora a 10 mL. Para preparar la solución con sustrato se toma en cuenta el volumen que se vaya a necesitar, para preparar 2 mL: 4.3 mg de HHL (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA) (aforados a 2 mL de amortiguador de borato 0.1 M pH 8.3

Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, cloruro de sodio 0.4M, pH 8.3:

- 0.174 g de fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) aforado a 10 mL.
- 0.136 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) aforado a 10 mL.

Se agrega el fosfato de potasio monobásico al fosfato de potasio dibásico hasta alcanzar el pH de 8.3.

- 0.233 g de cloruro de sodio (NaCl) aforado en el amortiguador de fosfatos previamente preparado

Para preparar la enzima ACE (EC. 3.4.15.1 de pulmón de conejo, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA) (ésta se encuentra liofilizada) se toma en cuenta las unidades por gramo de sólido: 5.5 unidades /mg de sólido, 0.25 mg de sólido son 1.375 unidades totales; esto se resuspende en 1.375 mL para tener 1U/mL.

Solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M pH 8.3:

- 17.4 g de fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) aforado a 500 mL.
- 2.74 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) aforado a 100 mL.

Se agrega el fosfato de potasio monobásico al fosfato de potasio dibásico hasta alcanzar el pH de 8.3.

Solución de 2,4,6 tricloro-s-triazina (TT) 3% en dioxanos:

3 g de TT se aforan a 100 mL con dioxano (TT y dioxano de Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA).

Soluciones para la determinación de la actividad antitrombótica

Solución amortiguadora Tris-HCl pH 7.2:

- 0.7 mg de cloruro de sodio (NaCl)
- 605.7 mg de tris

Se ajusta el pH con ácido clorhídrico (HCl) hasta alcanzar el pH de 7.2, se afora a 100 mL.

Para la preparación de:

- Fibrinógeno 0.1 %, 10 mg en 10 mL de amortiguador.
- Heparina 1 %, 10 mg en 1 mL de amortiguador.

Trombina 12 U/mL, esta se encuentra liofilizada, para 200 U se disuelve en 1.666 mL de amortiguador para obtener un stock de 120 U/mL, para la prueba se toman 10 µL del stock y se le agregan 90 µL de amortiguador. (Fibrinógeno, heparina y trombina humana EC. 3.4.15.1, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA) la pepsina

Soluciones para HPLC exclusión molecular

Todas las soluciones para HPLC se pasan por filtros de 0.22 µm.

Fase móvil (Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 6.8):

- 4.96 g de fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4)
- 9.73 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)

Se aforan a 1 L, si el pH no queda en 6.8, se ajusta con ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio NaOH) según sea necesario.

Solución de lavado, amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 3: 13.79 g aforados a 1 L, el pH se ajusta a 3 con ácido clorhídrico (HCl).

Solución de almacenamiento prolongado, metanol 10 %: 20 mL de metanol aforado a 200 mL con agua. Antes de pasar esta solución por la columna, pasar al menos 5 volúmenes de columna (70 mL aproximadamente) de agua.

Soluciones para RP-HPLC

Todas las soluciones para HPLC se pasan por filtros de 0.22 µm.

Solución A, 0.1 % ácido trifluoro acético (TFA): 1 mL de TFA aforado a 1 L de agua

Solución B, 0.1 % TFA en acetonitrilo : 0.1% TFA en agua, 90:10 : 0.9 mL TFA en 900 mL más 100 mL de la solución A. (ACN y TFA de J.T. Baker, Xalostostoc, Edo. de México, México)

Solución de lavado, acetonitrilo 95%: 475 mL de acetonitrilo aforado a 500 mL con agua.

Solución de almacenamiento prolongado, acetonitrilo 65 %: 325 mL de acetonitrilo aforado a 500 mL de agua.

Soluciones para la digestión con pepsina y tripsina

Solución cloruro de potasio (KCl) 0.1 M pH 2: 74 mg de cloruro de potasio aforado a 10 mL, el pH se ajusta con ácido clorhídrico (HCl) 10N.

Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.5):

- 0.116 g de fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4)
- 0.045 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)

Se aforan a 10 mL, si el pH no queda en 7.5, se ajusta con ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio NaOH) según sea necesario.

Ácido clorhídrico (HCl) 10 N: 9.872 mL de ácido clorhídrico 10.13 N aforado a 10 mL

Hidróxido de sodio (NaOH) 10 N: 2.12 g de hidróxido de sodio 94.98 % puro aforado a 5 mL.

Pepsina y tripsina: 1 mg de enzima en 1 mL de la solución correspondiente (pH 2 para pepsina y pH 7.5 para tripsina). Se hicieron diluciones para tener enzima a 0.1, 0.01 y 0.001 mg/mL. Ambas enzimas se usaron según el sustrato en una proporción 1: 25, enzima : sustrato (pepsina, E.C. 3.4.23.1 de mucosa gástrica porcina, 345 U/mg sólido y tripsina, E.C. 3.4.21.4 de páncreas bovino, 13 816 U/mg de sólido, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA).

Curvas patrón

Curva patrón de la técnica de TNBS

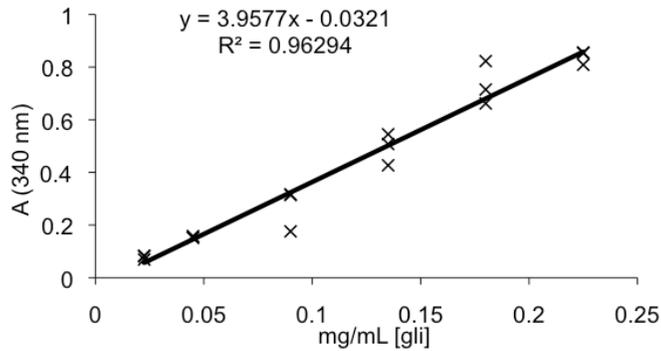


Figura 18. Curva patrón de glicina para la técnica de TNBS

Curva patrón de concentración, HPLC (corazonina)

El undecapéptido corazonina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) tiene una masa molecular de 1.36 kDa su estructura es ETFQYSRGWTN.

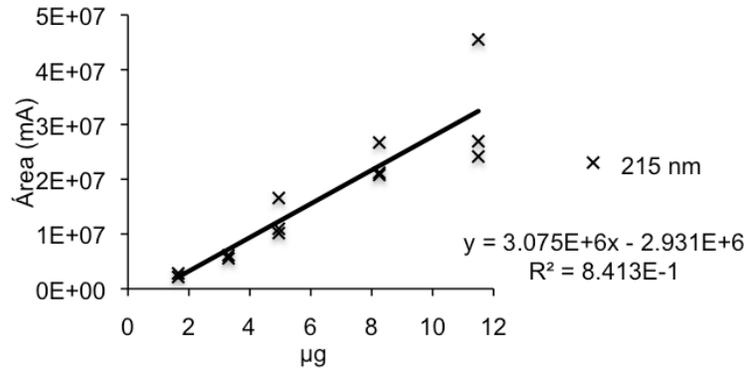


Figura 19. Curva patrón de corazonina a 215 nm para HPLC.

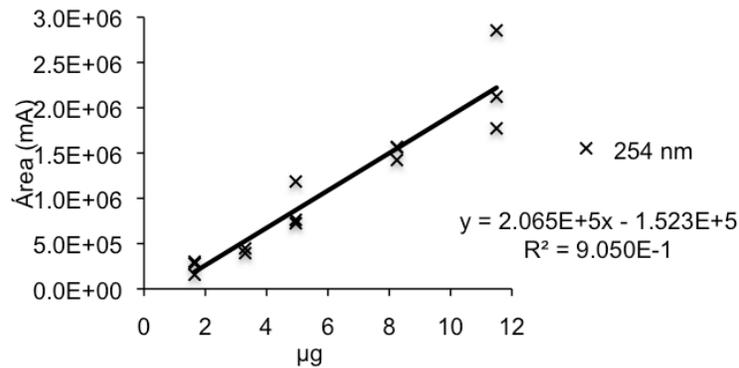


Figura 20. Curva patrón de corazonina a 254 nm para HPLC.

Péptidos bioactivos de suero de leche y caseínas liberados por la actividad proteolítica de *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*

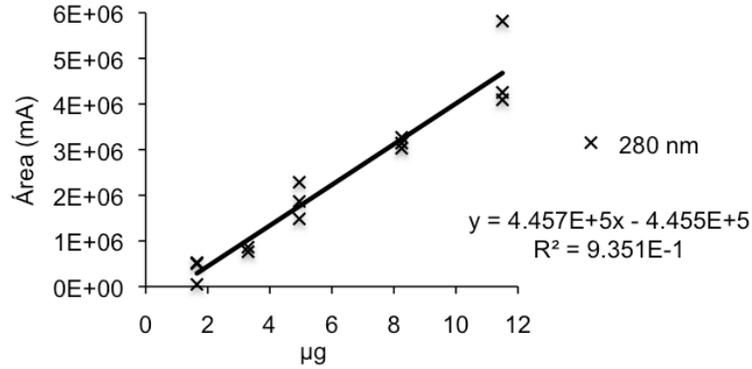


Figura 21. Curva patrón de corazonina a 280 nm para HPLC.

Curva patrón de masas molares HPLC (estándar de polipéptidos)

Los péptidos presentes en el estándar de polipéptidos (BioRad California, EUA) se presenta en la siguiente tabla

Tabla 9. Estándar de polipéptidos.

Péptido	Masa molar (kDa)
Triosa fosfato isomerasa	26.625
Mioglobina	16.950
α -lactoalbumina	14.437
Aprotinina	6.517
Insulina cadena b, oxidada	3.423
Bacitracina	1.423

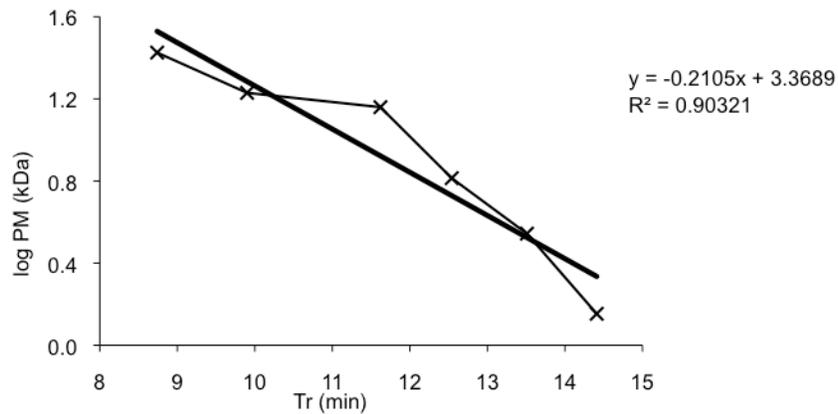
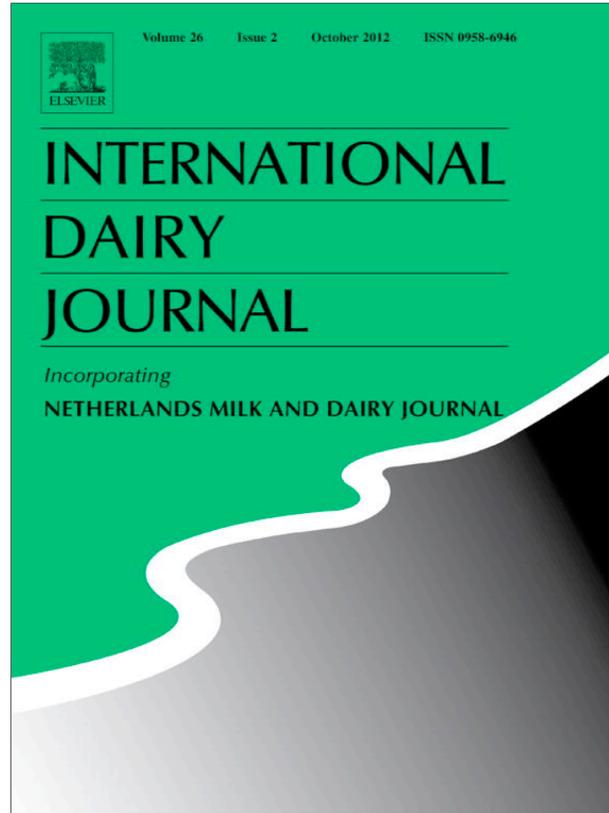


Figura 22. Curva patrón para HPLC del estándar de polipéptidos.

Artículo publicado

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota

Rebeca Rojas-Ronquillo^a, Alma Cruz-Guerrero^a, Angélica Flores-Nájera^a, Gabriela Rodríguez-Serrano^a, Lorena Gómez-Ruiz^a, Juan Pablo Reyes-Grajeda^b, Judith Jiménez-Guzmán^a, Mariano García-Garibay^{a,c,*}

^aDepartamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186, Colonia Vicentina CP 09340, Distrito Federal, Mexico

^bInstituto Nacional de Medicina Genómica, Periférico Sur 4809, Colonia Arenal Tepepan CP 14610, Distrito Federal, Mexico

^cDepartamento de Ciencias de la Alimentación, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Lerma. Av. Hidalgo Poniente 46, Colonia La Estación, CP 52006, Lerma de Villada, Edo. de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 January 2012

Received in revised form

4 May 2012

Accepted 15 May 2012

ABSTRACT

Inhibition of angiotensin-converting enzyme (ACE) and antithrombotic properties of peptides released from bovine caseins during fermentation by *Lactobacillus casei* Shirota and *Streptococcus thermophilus* were determined. Both species released ACE inhibitory peptides, whereas only *Lb. casei* Shirota produced antithrombotic activity. The highest thrombin inhibitory activity, 80.7%, was observed at 27 h of fermentation by *Lb. casei* Shirota. Active peptides were purified by HPLC; seven peptides were obtained, and their resistance to digestive enzymes, pepsin and trypsin, was evaluated. The most active peptide even after the hydrolysis was identified as YQEPVLGPPVRGPFPIIV (fragment 193–209 of β -casein): it had an inhibition efficiency ratio for ACE of 0.14%/peptide concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$), and a thrombin inhibition efficiency ratio of 4.6%/peptide concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$). This peptide had been previously reported as an ACE-inhibitor, but this is the first time that it is evaluated for its thrombin inhibition activity.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Fermented milk has been associated with health benefits for a long time. In the last three decades, much research has been done attributing health benefits to probiotic lactic acid bacteria used in milk fermentation. These benefits are primarily related to survival and implementation of probiotic bacteria in the gastrointestinal tract; however, beyond these benefits, others could arise from indirect effects such as the production of bioactive peptides released by lactic acid bacteria from milk proteins. Milk proteins have been widely studied as a source of bioactive peptides (Erdmann, Cheung, & Schröder, 2008; Korhonen & Pihlanto, 2006; Muro-Urista, Álvarez-Fernández, Riera-Rodríguez, Arana-Cuenca, & Téllez-Jurado, 2011). In particular, caseins contain within their structure a variety of peptides that can affect different systems: nervous, immune, nutritional and cardiovascular (Silva & Malcata, 2005); furthermore, there are sequences with two or more functions (Meisel, 2004). These peptides may be released via milk fermentation by lactic acid

bacteria (Möller, Scholz-Ahrens, Roos, & Schrezenmeir, 2008), including probiotic bacteria (Shah, 2007). *Lactobacillus casei* is a probiotic (Perdigón, Alvarez, & Pesce de Ruiz Holgado, 1991) widely recognized and used in fermented milk products; in addition to this property, human trials have demonstrated the hypotensive ability of milk fermented by this species (FitzGerald & Murray, 2006). González-González, Tuohy, and Jauregi (2011) found that milk fermented by *Lb. casei* YIT 9029 is capable of inhibiting angiotensin-converting enzyme (ACE); this is explained by the production of bioactive peptides. Rokka, Syväoja, Tuominen, and Korhonen (1997) reported bioactive peptides in milk fermented by *Lactobacillus* GG, and expressed that certain probiotic properties attributed to this strain could be partially explained by these peptides. Mugerza et al. (2006) reported the antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis*, which produced peptides with angiotensin-converting enzyme inhibitory activity.

The main bioactive peptides studied are those with antihypertensive activity (Korhonen & Pihlanto, 2006), which act as inhibitors of ACE. Most antihypertensive peptides are released from caseins (Saito, 2008; Silva & Malcata, 2005). Those with the highest antihypertensive activity are the tripeptides IPP and VPP, derived from β -casein, which have been found in milk fermented by

* Corresponding author. Tel.: +52 728 282 2785.
E-mail address: jmgg@xanum.uam.mx (M. García-Garibay).

Lactobacillus helveticus and *Saccharomyces cerevisiae* (Nakamura, Yamamoto, Sakai, & Takano, 1995).

Other peptides acting on the cardiovascular system are those with antithrombotic activity; these have been reported in milk protein hydrolysates and in other food proteins (Yang, Wang, & Xu, 2007; Zhang, Wang, & Xu, 2008). Blood coagulation is a complex process in which a cascade of responses operates with several coagulation factors and enzymes involved, and because of this, there are various mechanisms to inhibit thrombus formation (Gresele & Agnelli, 2002; Hirsh, O'Donnell, & Weitz, 2005). The reported antithrombotic peptides derived from milk proteins are casoplatelin (MAIPPKKNQDDK) and KRDS peptide (Rutherford & Gill, 2000). Casoplatelin is the 106–116 fragment from bovine κ -casein, and inhibits platelet aggregation and fibrinogen binding (Jollès et al., 1986), and KRDS peptide is the fragment 39–42 from human lactoferrin, studied for its similarity to the RGDS peptide derived from the α -fibrinogen chain (fragment 572–575), which inhibits platelet aggregation (Raha et al., 1988). These antithrombotic peptides have been obtained by enzymatic hydrolysis or by chemical synthesis, but there are no reports of them being produced by fermentation.

Production of bioactive peptides in fermented milk is due to the proteolytic system of lactic acid bacteria, which has been widely studied, especially for its ability to hydrolyse caseins (Savijoki, Ingmer, & Varmanen, 2006). In particular, the proteolytic activity of *Lb. casei* has been studied and reviewed by several authors (Khalid & Marth, 2010; Kojic, Fira, Banina, & Topisirovic, 1991). The main components of this system are the cell envelope proteins; these enzymes are responsible for extracellular hydrolysis of milk proteins during fermentation (Lozo et al., 2011). The specificity of these enzymes varies according to the species, and, jointly with the conditions of fermentation, establishes the diversity of peptides found in the fermented product (González-Olivares et al., 2011; Nielsen, Martinussen, Flambard, Sorensen, & Otte, 2009).

González-Olivares et al. (2011) established that Soful, a commercial product formed by fermenting milk with *Lb. casei* Shirota and *Streptococcus thermophilus*, could contain several bioactive peptides. The aim of this work was to study the antithrombotic and ACE inhibitory properties of peptides released during casein fermentation by the probiotic *Lb. casei* Shirota and *St. thermophilus* isolated from this commercial fermented milk.

2. Materials and methods

2.1. Peptide analysis of the commercial fermented milk

Soful (Yakult®, Mexico) was centrifuged at $12,845 \times g$ for 30 min at 4 °C (Beckman J2-MI, with JA-20.1 rotor; Beckman, Brea, CA, USA), then the supernatant was analysed for peptides by SDS-PAGE as reported by Schägger and von Jagow (1987), using a Mini-Protean II cell (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Gels were stained with Coomassie Blue and scanned for identification using a Gel-Doc (Bio-Rad, Labarataries).

2.2. Microorganism isolation

Lb. casei Shirota and *St. thermophilus* were isolated from the commercial fermented milk, Soful (Yakult®). The product was diluted in 0.5% peptone water under sterile conditions. Several dilutions were performed and the grown on MRS agar plates (Difco, Detroit, MI, USA). The resulting isolated colonies were taken and streaked three successive times. Morphology and Gram staining confirmed purity of the final isolated colonies. *Lb. casei* Shirota and *St. thermophilus* were kept at 4 °C on MRS slants.

2.3. Fermentation

Fermentations were conducted in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of casein medium with 3% casein (Hammarsten, Research Organics; Cleveland, OH, USA), 5% lactose (BD Bioxon, Mexico City, Mexico) and 1.17% YCB (yeast carbon base; Difco, Detroit, MI, USA). The medium was heat treated (90 °C for 20 min) once its pH was adjusted to 7.5. The inoculum was pre-cultured in skim milk (Difco) for 24 h at 37 °C. Casein medium was inoculated with the appropriate amount to reach an initial count of 10^7 cfu mL⁻¹. The fermentations were performed at 37 °C for 42 h. Fermentation experiments were done in triplicate. Samples were taken at 0, 15, 21, 27, 36 and 42 h. Sample pH was adjusted to 9 (to solubilise casein) and centrifuged at $25,000 \times g$ for 30 min at 4 °C (Beckman); the supernatants were recovered to determine antithrombotic and ACE-inhibitory activity, and stored at –4 °C for further analysis.

2.4. ACE inhibition

The ACE-inhibitory activity was determined as described by Fuglsang, Nilsson, and Nyborg (2002), and modified as described below. The activity of ACE was measured by the production of hippuric acid. Hippuryl-histidyl-leucine (HHL; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) (5 mM) was dissolved in 100 mM sodium borate buffer (pH 8.3) containing 0.3 M NaCl. The reaction was carried out as follows: an aliquot of 80 μ L of fermentation supernatant was added to 200 μ L of HHL and 20 μ L of ACE at 0.25 U mL⁻¹ (EC 3.4.15.1, Sigma–Aldrich). The mixture was incubated at 37 °C for 30 min. The reaction was stopped by heating (10 min, 95 °C). Hippuric acid liberated by ACE was determined by the reaction with 2,4,6-trichloro-S-triazine (TT; Sigma–Aldrich), as described by Hayakari, Kondo, and Izumi (1978). Percent of inhibition was calculated using Equation (1):

$$\text{Inhibition activity\%} = [(E_c - E_s)/(E_c - E_b)] \times 100 \quad (1)$$

where E_c is the absorbance of the reaction mixture without fermentation supernatants (control), E_s is the absorbance of the reaction mixture (fermentation supernatants), and E_b is the absorbance in the fermentation supernatants after heating (blank).

Inhibition efficiency ratio (IER) was calculated as reported by Chen, Tsai, and Pan (2007) using Equation (2):

$$\text{IER} = \text{Inhibition activity\%/peptide concentration} \quad (2)$$

Peptide concentration was determined by RP-HPLC, and expressed in μ g mL⁻¹.

2.5. Thrombin inhibition

The antithrombotic activity was determined by the inhibition of fibrin cross-linking which is responsible for the clotting activity, using the method described by Zhang et al. (2008); a heparin positive control was performed. Fibrinogen, thrombin (EC 3.4.15.1) and heparin were from Sigma–Aldrich. IER was calculated using Equation (2).

2.6. Purification and identification of thrombin inhibitory peptides

The peptides in supernatant fractions obtained after fermentation were separated by size exclusion chromatography (SE-HPLC). The separation was performed on an Alliance HPLC system (Lab Alliance; State College, PA, USA) equipped with a photodiode array detector (Spectra System Thermo Scientific Products; Waltham, MA, USA). The column used in the first purification step was a Bio

Sep-Sec-S 2000 (300 mm × 7.8 mm × 5 µm; Phenomenex; Torrance, CA, USA). The peptides were eluted with 100 mM phosphate buffer (pH 6.8) at a flow rate of 0.9 mL min⁻¹. The elution was monitored at 254 and 280 nm. The fractions were collected, dried under vacuum (Freeze Dry System; Labconco; Kansas City, MO, USA) and antithrombotic activity was measured. After that, the active fractions were separated by RP-HPLC using a Jupiter C18 300A column (250 mm × 4.6 mm × 5 µm; Phenomenex). The peptides were eluted using a linear gradient from 100% to 30% in 30 min, of solvent A (0.1% trifluoroacetic acid [TFA]) against solvent B (9:1 ratio of 0.1% TFA in acetonitrile [ACN] and 0.1% TFA in water) at a flow rate of 1 mL min⁻¹. ACN and TFA were from JT Baker (Xalostoc, Edo. de Mexico, Mexico). The elution was monitored at 254 nm. Finally, the active peptides obtained were subjected to isocratic runs with the same reverse-phase column (Jupiter C18 300A) to confirm their purity.

The amino acid sequence of purified peptides was determined by means of a 4700 proteomics analyzer MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems, Carlsbad CA, USA). MS spectra were recorded on the mass range *m/z* 400–2000. Tandem mass spectra (MS/MS) were recorded in an automated mode on the three most intense ions detected by MS. Fragmentation of ions was done by collision induced dissociation in the ion trap, with an activation time of 30 ms and a normalized collision energy of 35%. Raw data collected during the MS/MS run were processed by ProteinPilot software 2.0.1. Protein identification was achieved by searching sequence data using protein BLAST[®] (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Protein identifications were compared and best matches were validated taking into account Score and Expected (E) value. The ExpASY PeptideCutter tool (Gasteiger et al., 2005) was used to determine the theoretical sequences.

2.7. Gastric enzyme digestion

The purified peptides were dissolved in 100 µL of aqueous solution and adjusted to pH 2 with 10 N HCl. The samples were first hydrolysed with pepsin (EC 3.4.23.1; 345 U mg⁻¹; Sigma–Aldrich), with an enzyme:substrate ratio of 1:25 (w/w), for 90 min at 37 °C, pH 2 with constant shaking at 150 rpm. The reaction was finished by heating at 95 °C for 10 min. The reaction mixture was neutralized (pH 7) using 10 N NaOH. Immediately the sample was hydrolysed with trypsin (EC 3.4.21.4; 13,816 U mg⁻¹; Sigma–Aldrich), with an enzyme:substrate ratio of 1:25, at pH 7.5, 37 °C for 240 min with constant shaking at 150 rpm. The reaction was stopped by heating at 95 °C for 10 min (Ohsawa et al., 2008; Quirós, Contreras, Ramos, Amigo, & Recio, 2009). Thrombin inhibition activity was determined in the resulting digested sample and analysed by RP-HPLC.

2.8. Statistical analyses

One-way ANOVA ($P > 0.05$) and independent-samples *t*-student test were used for statistical analyses. Analyses were done using the NCSS 2001 software (Kaysville, UT, USA).

3. Results and discussion

3.1. Peptides in the commercial fermented milk

A commercial dairy product fermented by *Lb. casei* Shirota and *St. thermophilus* (Soful) was analysed by polyacrylamide gel electrophoresis and SE-HPLC to determine its peptide profile. Several bands corresponding to peptides with different molecular mass were observed in the electrophoresis gels (Table 1). To observe peptides of lower molecular mass, SE-HPLC was run. Several

Table 1

Molecular mass of peptides in the commercial fermented milk (Soful) analysed by SDS-PAGE and size exclusion chromatography (SE-HPLC), and casein bioactive peptides reported with similar molecular mass.

Tricine molecular mass (kDa)	SDS-PAGE molecular mass (kDa)	SE-HPLC molecular mass (kDa)	Reported bioactive peptides molecular mass (kDa)	Reported bioactivity ^c
6.40	5.97	6.089 ^b	6.089 ^b	ACE inhibitor
5.33	4.83	4.806 ^b	4.806 ^b	Antimicrobial
3.69	3.90	3.669 ^a	3.669 ^a	Immunomodulating
2.70	2.95	2.801 ^b /2.764 ^a	2.801 ^b /2.764 ^a	ACE Inhibitor/Antimicrobial
1.87		1.881 ^b	1.881 ^b	ACE Inhibitor, antimicrobial
1.71	1.64	1.669 ^a	1.669 ^a	ACE Inhibitor
	1.39	1.384 ^a /1.386 ^a	1.384 ^a /1.386 ^a	Antithrombotic/CPP
	0.73	0.784 ^a /0.748 ^a	0.784 ^a /0.748 ^a	Antithrombotic/Immunomodulating
	0.47	0.503 ^a /0.532 ^b	0.503 ^a /0.532 ^b	Antithrombotic/ACE inhibitor

^a Silva and Malcata (2005).

^b Hong et al. (2008).

^c ACE, angiotensin-converting enzyme; CPP, caseinophosphopeptide.

bioactive peptides reported elsewhere are consistent with the molecular mass of fractions shown in Table 1; then, it is very likely that some of the peptides found in Soful could have diverse bioactivities. Furthermore, there are several reports that fermented milk has different bioactivities (Hayes, Stanton, FitzGerald, & Ross, 2007a; Muro-Urista et al., 2011). Many bioactive peptides reported in fermented milk are released by the action of the proteolytic system of the lactic acid bacteria; *Lb. helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* are cases in point which have been widely studied (Hayes et al., 2007a; Korhonen & Pihlanto, 2006; Matar, LeBlanc, Martin, & Perdígón, 2003). On the other hand, other lactic acid bacteria, such as *Lb. casei*, have been less studied; however, there are reports that milk fermented by this species may contain peptides with various bioactivities. González-Olivares et al. (2011) studied the concentration and molecular mass of peptides in several dairy commercial products, finding particularly high concentrations of peptides in Soful. Kawase, Hashimoto, Hosoda, Morita, and Hosono (2000) found that concentrated milk supplemented with whey protein concentrate and fermented by *Lb. casei* and *St. thermophilus* showed an effect lowering serum lipid levels and hypotensive activity in humans and in animal models. ACE-inhibitory activity in milk fermented with *Lb. casei* YIT 9029 was reported (González-González et al., 2011). These reports are consistent with results observed in the present work. Table 1 shows that several peptides could have ACE-inhibitory and antithrombotic activities, particularly those with the lowest molecular mass. Therefore, in order to demonstrate the capability to produce bioactive peptides of the specific bacteria used in Soful, a search of peptides derived from caseins with ACE inhibitory and antithrombotic properties released by *Lb. casei* Shirota and *St. thermophilus* was done.

3.2. Thrombin and ACE inhibition activities in fermented casein

Casein fermentations were performed to assess the ability to generate bioactive peptides by *Lb. casei* Shirota and *St. thermophilus*. The ability to inhibit ACE and thrombin from fermentations with each species were determined. The ACE-inhibitory activity (Fig. 1) had a significant increase beyond 21 h in both fermentations, and no significant difference between *Lb. casei* Shirota and *St. thermophilus* was observed. The highest ACE inhibition was 20.2% at 36 h with *Lb. casei* Shirota. González-González et al. (2011) found an ACE inhibitory activity higher than 90% with *Lb. casei* Shirota YIT 9029; other authors also report ACE-inhibitory activities from casein fermentation with other lactobacilli: *Lactobacillus animalis* (85%; Hayes

Péptidos bioactivos de suero de leche y caseínas liberados por la actividad proteolítica de *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*

150

R. Rojas-Ronquillo et al. / International Dairy Journal 26 (2012) 147–154

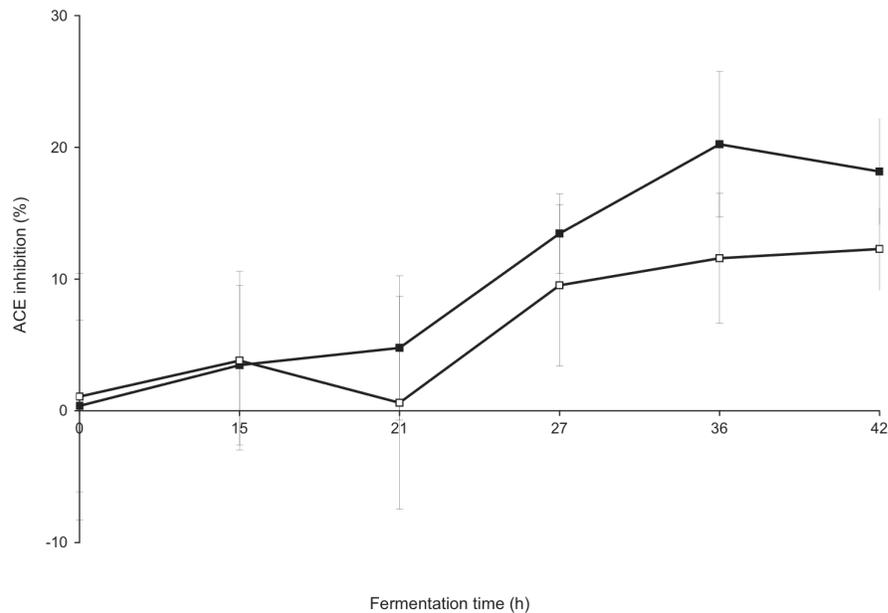


Fig. 1. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition during casein fermentation by *Lb. casei* Shirota (■), and *St. thermophilus* (□) isolated from the commercial fermented milk. The data are means \pm SD of 3 determinations.

et al., 2007b) and *Lb. helveticus* (71%; Robert, Razaname, Mutter, & Juillerat, 2004). According to Nielsen et al. (2009), fermentation conditions may influence the size and function of the peptides produced, which, together with the variety of the species used in this work, could explain the difference in ACE inhibition observed. In Fig. 2, thrombin inhibition is shown, in which an activity increase was observed along the fermentation only for *Lb. casei* Shirota. The highest thrombin inhibition (80.7%) was reached at 27 h. Antithrombotic peptides have not been reported to be released by milk fermentation (Erdmann et al., 2008).

3.3. Purification of antithrombotic peptides

Purification of the inhibitory peptides was carried out through various HPLC stages. The supernatants selected from the casein fermentation by *Lb. casei* Shirota were first separated by SE-HPLC to recover peptide fractions with antithrombotic activity. Fractions with molecular mass lower than 6 kDa were collected (Fig. 3). The highest IER obtained from the sample of 27 h was 0.73%/peptide concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$), corresponding to the fraction 6A. For the 36 h sample the highest IER was 0.78%/peptide concentration (μg

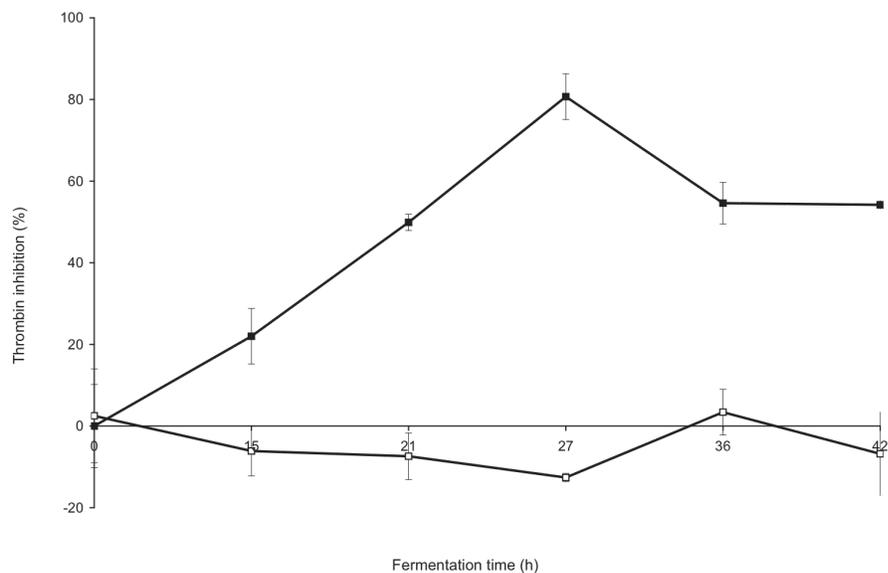


Fig. 2. Thrombin inhibition during casein fermentation by *Lb. casei* Shirota (■), and *St. thermophilus* (□) isolated from the commercial fermented milk. The data are means \pm SD of 3 determinations.

mL⁻¹), corresponding to the fraction 5B. Every fraction displaying antithrombotic activity was selected (6A, 8A, 5B, 7B and 9B) and further purified by RP-HPLC. Each peptide was collected, concentrated and tested again for its ability to inhibit clot formation (Fig. 4). Peptide 7 shows the best IER of thrombin with 4.6%/peptide concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$), a value higher than that obtained for the positive control of heparin (0.7%/peptide concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$) and that reported by Zhang et al. (2008) from a hydrolysed rapeseed (0.03%/peptide concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)).

3.4. Digestion with gastric enzymes

Purified peptides were subjected to the gastric enzymes pepsin and trypsin, in order to test the possible persistence of bioactivity after digestion. All peptides were broken up by the action of gastric enzymes, which was observed by RP-HPLC, and antithrombotic activity of the resulting hydrolysates was subsequently determined (Fig. 4). As can be seen in Fig. 4, enzymatic digestion had a different effect on the activity of each peptide: peptides 1 and 2 completely lost their activity, and the activity of peptide 3 was significantly decreased, whereas the activity of peptides 4–7 remained

unchanged after digestion. Even though the antithrombotic activity of peptides 4–7 was not affected by digestion, only the IER of peptide 7 was high enough to be interesting; hence it was selected for identification. Fig. 5 shows the chromatograms before and after digestion of this peptide, where the formation of two fragments can be observed.

One of the main problems of the bioactive peptides in general is their bioavailability after consumption (Meisel, 2004), resistance to gastric enzymes being the first challenge for biological activity (Vermeirssen, Van Camp, & Verstraete, 2004). The results of peptide 7 suggest that, when this peptide is ingested and hydrolysed during digestion, its biological activity could continue. Quirós et al. (2009) had similar results evaluating the behaviour of the ACE-inhibitory peptides after being subjected to simulated gastric digestion; some peptides lost activity after hydrolysis but others maintained or increased their ACE inhibitory activity.

3.5. Amino acid sequence of thrombin inhibitor peptide

The sequence of peptide 7 was identified by mass spectrometry (MALDI-TOF), with 99% confidence, with a score of 58.7 and an E

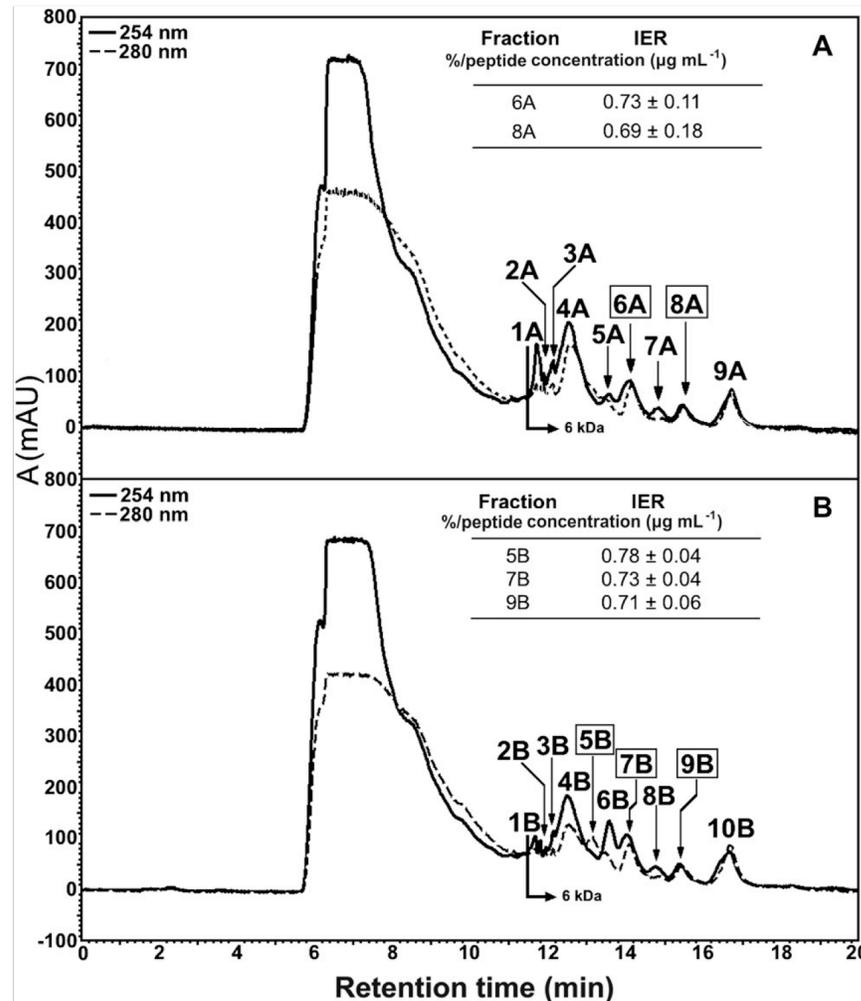


Fig. 3. Fractions recovered by size exclusion HPLC of samples at 27 h (A) and 36 h (B) taken from the casein fermentation by *Lb. casei* Shirota. Fractions marked with a frame are those which show thrombin inhibition activity, and their inhibition efficiency ratio (IER) appears in the figure.

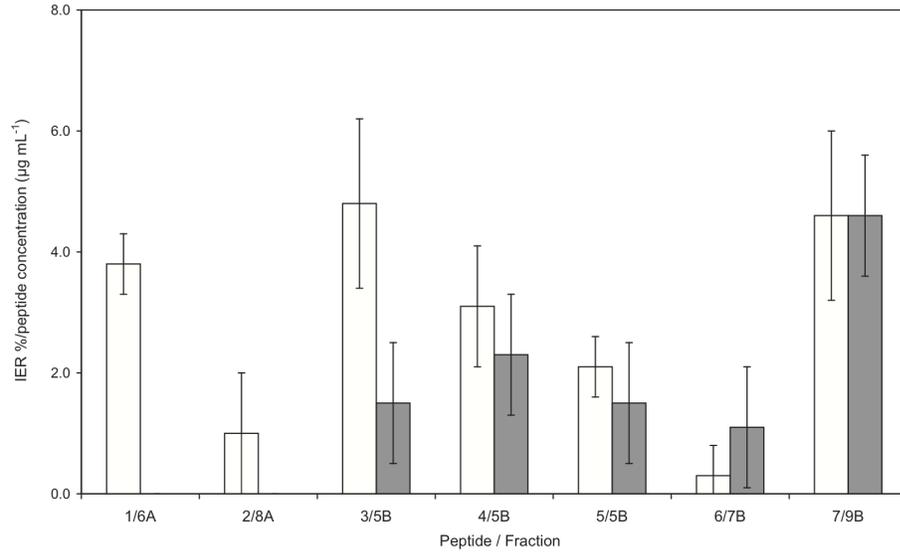


Fig. 4. Thrombin inhibitory activity (IER) of peptides purified by RP-HPLC before (□) and after (■) digestion with trypsin and pepsin. The data are means \pm SD of 3 determinations.

value of 3×10^{-15} . The sequence was identified as the C-terminal fragment of β -casein (f 193–209), with the following amino acid sequence: YQEPVLGPVRGPFPIIV, having a molecular mass of 1.88 kDa. The identified peptide is commonly released during fermentation of milk (Hernández-Ledesma, Miralles, Amigo, Ramos, & Recio, 2005; Lozo et al., 2011; Robert et al., 2004). Table 2 shows peptides or fragments reported elsewhere with the same sequence found for peptide 7, exhibiting various activities including the inhibition of ACE. The ability of the purified peptide 7 to inhibit ACE was determined, resulting in an IER value of 0.14%/peptide concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$), demonstrating that even though it is not particularly potent, peptide 7 may exert such bioactivity.

Multifunctional peptides like peptide 7 have already been reported; primary structures in caseins have regions containing

overlapping sequences of peptides that exert different biological activities; these seem to be strategic sequences that appear to be partially protected from proteolysis (Fiat & Jollés, 1989). Multifunctional bioactive peptides commonly present large sequences of amino acids where two smaller sequences overlap with different bioactivities, resulting in the retention of their bioactivity even after being hydrolysed (Meisel, 2004). Peptide 7 seems to be one of these multifunctional peptides, since it had both antithrombotic and ACE inhibitory properties. Digestion of peptide 7 led to two fragments (Fig. 5) (discussed in Section 3.4). Using ExPASy PeptideCutter tool and departing from peptide 7 sequence, it was determined that pepsin and trypsin would hydrolyse this peptide in fragments GPFPIIV and QEPVLGPVR. This could establish that the two peptides observed in Fig. 5

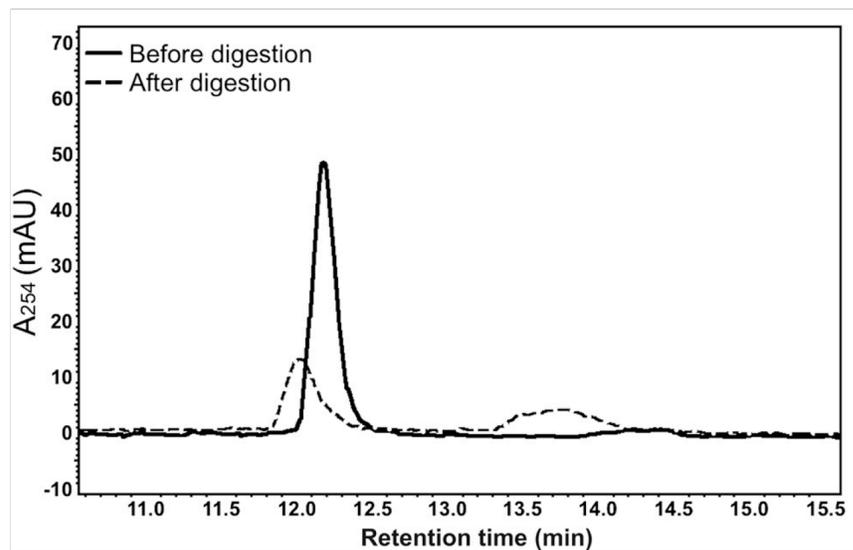


Fig. 5. RP-HPLC chromatogram of peptide 7, before and after digestion with pepsin and trypsin digestion.

Péptidos bioactivos de suero de leche y caseínas liberados por la actividad proteolítica de *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*

R. Rojas-Ronquillo et al. / *International Dairy Journal* 26 (2012) 147–154

153

Table 2
Bioactive peptides with the same sequence found for peptide 7 reported by other authors and the type of hydrolysis that produced them.

Fragment	Peptide	Hydrolysis	Bioactivity ^a	Reference
193–209	YQEPVLGVRGPFPIIV	Extracellular proteinase ^b	ACE inhibitor	Yamamoto et al., 1994
193–209	YQEPVLGVRGPFPIIV	Chymosin	Antimicrobial	Sandre et al., 2001
193–209	YQEPVLGVRGPFPIIV	Chymosin, Synthetic	Immunomodulatory	Coste et al., 1992
193–209	YQEPVLGVRGPFPIIV	PrtP, cell-envelope proteinase ^c	ND	Lozo et al., 2011
194–209	QEPVLGVRGPFPIIV	PrtP, cell-envelope proteinase ^{c,d}	ND	Lozo et al., 2011
193–206	YQEPVLGVRGPFPP	PrtP, cell-envelope proteinase ^{c,d}	ND	Lozo et al., 2011
194–206	QEPVLGVRGPFPP	PrtP, cell-envelope proteinase ^{c,d}	ND	Lozo et al., 2011
197–209	VLGVRGPFPIIV	<i>Enterococcus faecalis</i>	ACE inhibitor	Quirós et al., 2009
199–209	GPVRGPFPIIV	<i>Lactobacillus animalis</i> DPC6134	ACE inhibitor	Hayes et al., 2007b
199–209	GPVRGPFPIIV	PrtP, cell-envelope proteinase ^{c,d}	ND	Lozo et al., 2011
193–202	YQEPVLGVR	<i>Lactobacillus GG</i> + pepsin + Trypsin	ACE inhibitor	Rokka et al., 1997
197–206	VLGVRGPFPP	<i>Enterococcus faecalis</i>	ACE inhibitor	Quirós et al., 2009
201–209	VRGPFPIIV	<i>Enterococcus faecalis</i>	ACE inhibitor	Quirós et al., 2009
199–206	GPVRGPFPP	PrtP, cell-envelope proteinase ^{c,d}	ND	Lozo et al., 2011
193–108	YQEPVL	<i>Lactobacillus helveticus</i> NCC 2765	ACE inhibitor	Robert et al., 2004
193–108	YQEPVLGVR	PrtP, cell-envelope proteinase ^{c,d}	ND	Lozo et al., 2011
203–209	GPFPIIV	PrtP, cell-envelope proteinase ^d	ND	Lozo et al., 2011
194–200	QEPVLGP	PrtP, cell-envelope proteinase ^e	ND	Lozo et al., 2011
203–208	GPFPII	PrtP, cell-envelope proteinase ^d	ND	Lozo et al., 2011
194–198	QEPVL	PrtP, cell-envelope proteinase ^{c,d,e}	ND	Lozo et al., 2011

^a ND, not determined.

^b From *Lactobacillus helveticus* CP790.

^c From *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14.

^d From *Lactobacillus rhamnosus* BGT10.

^e From *Lactobacillus helveticus* BGRA43.

(dotted line) correspond to these fragments, which have been found in gastric digestion simulations by Hernández-Ledesma, Amigo, Ramos, and Recio (2004). Additionally, Quirós et al. (2009) found that the mixture of fragments VRGPFPIIV, VRGPFPI and GPFPI, resulting from digestion of the peptide VRGPFPIIV (β -casein f 201–209), and VLGVR and LGVR, from digestion of the peptide VLGVRGPFPP (β -casein f 197–206), retained the ability to inhibit ACE, which is in agreement with the results obtained here. Furthermore, the peptides QEPVLGVR and GPFPIIV, separately or jointly, were responsible not only for the inhibition of ACE, but also showed antithrombotic activity which had not been reported previously either for the whole peptide or its fragments.

Until now, the only known peptides with antithrombotic activity obtained from caseins are the casoplatelins derived from fragment 106–116 (MAIPPKKNQDDK) of κ -casein; these inhibit clot formation, affecting the action of platelets. In this study, the antithrombotic activity was determined by the inhibition of the proteolytic activity of thrombin upon fibrinogen, which is a different mechanism for the inhibition of clot formation, so it is possible that peptide 7, having a different sequence from that of casoplatelins, could also have antithrombotic activity.

4. Conclusions

Lb. casei Shirota was capable of releasing bioactive peptides from bovine casein. These peptides can inhibit the action of thrombin on fibrinogen. In particular, peptide 7, YQEPVLGVRGPFPIIV, showed activity as an ACE and thrombin inhibitor; antithrombotic properties of this peptide have not been previously described. The hydrolysed peptide maintained bioactivities against both ACE and thrombin.

Acknowledgements

The authors would like to thank the National Council of Science and Technology (CONACYT) in Mexico for the postgraduate scholarship awarded to Rebeca Rojas-Ronquillo.

References

- Chen, G. W., Tsai, J. S., & Pan, B. S. (2007). Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation. *International Dairy Journal*, 17, 641–647.
- Coste, M., Rochet, V., Leonil, J., Molle, D., Bouhallab, S., & Tome, D. (1992). Identification of C-terminal peptides from bovine β -casein that enhance proliferation of rat lymphocytes. *Immunology Letters*, 33, 41–46.
- Erdmann, K., Cheung, B. W. Y., & Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, 643–654.
- Fiat, A. M., & Jollés, P. (1989). Caseins of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: structural and physiological aspects. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 87, 5–30.
- FitzGerald, R. J., & Murray, B. A. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 118–125.
- Fuglsang, A., Nilsson, D., & Nyborg, N. C. B. (2002). Cardiovascular effects of fermented milk containing angiotensin-converting enzyme inhibitors evaluated in permanently catheterized, spontaneously hypertensive rats. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3566–3569.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., et al. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. In J. M. Walker (Ed.), *The proteomics protocols handbook*. New York City, NY, USA: Humana Press, Retrieved from. <http://www.expasy.org>.
- González-González, C. R., Tuohy, K. M., & Jauregi, P. (2011). Production of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with probiotic strains: effects of calcium, pH and peptides on the ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, 21, 615–622.
- 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, 179–188.
- Gresele, P., & Agnelli, G. (2002). Novel approaches to the treatment of thrombosis. *Trends in Pharmacology Science*, 23, 25–32.
- Hayakari, M., Kondo, Y., & Izumi, H. (1978). A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Analytical Biochemistry*, 84, 361–369.
- Hayes, M., Stanton, C., FitzGerald, G. F., & Ross, R. P. (2007a). Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: bioactive peptide functions. *Biotechnology Journal*, 2, 435–449.
- Hayes, M., Stanton, C., Slattery, H., O'Sullivan, O., Hill, C., FitzGerald, G. F., et al. (2007b). Casein fermentate of *Lactobacillus animalis* DPC6134 contains a range of novel propeptide angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4658–4667.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., & 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-Ledesma, B., Miralles, B., Amigo, L., Ramos, M., & Recio, I. (2005). Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1041–1048.

Péptidos bioactivos de suero de leche y caseínas liberados por la actividad proteolítica de *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*

- Hirsh, J., O'Donnell, M., & Weitz, J. I. (2005). New anticoagulants. *Blood*, 105, 453–463.
- Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W., & Chi, L. (2008). The antihypertensive effect of peptides: a novel alternative to drugs? *Peptides*, 29, 1062–1071.
- Jollès, P., Levy-Toledano, S., Fiat, A. M., Soria, C., Gillissen, D., Thomaidis, A., et al. (1986). Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from kappa-casein on platelet function. *European Journal of Biochemistry*, 158, 379–382.
- Kawase, M., Hashimoto, H., Hosoda, M., Morita, H., & 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.
- Khalid, N. M., & Marth, A. H. (2010). Proteolytic activity by strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*. *Journal of Dairy Science*, 73, 3068–3076.
- Kojic, M., Fira, D., Banina, A., & Topisirovic, L. (1991). Characterization of the cell wall-bound proteinase of *Lactobacillus casei* HN14. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1753–1757.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16, 945–960.
- Lozo, J., Strahinic, I., Dalgalarondo, M., Chobert, J. M., Haertlé, T., & Topisirovic, L. (2011). Comparative analysis of β -casein proteolysis by PrtP proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14, PrtP proteinase from *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 and PrtH proteinase from *Lactobacillus helveticus* BGRA43. *International Dairy Journal*, 21, 863–868.
- Matar, C., LeBlanc, J. G., Martin, L., & Perdigon, G. (2003). Biologically active peptides released in fermented milk: role and functions. In E. R. Farnworth (Ed.), *Handbook of fermented functional foods* (pp. 177–199). Boca Raton, FL, USA: CRC Press LLC.
- Meisel, H. (2004). Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *BioFactors*, 21, 55–61.
- Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., & Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47, 171–182.
- Muguerza, B., Ramos, M., Sánchez, E., Manso, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., et al. (2006). Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 16, 61–69.
- Muro-Urista, C., Álvarez-Fernández, R., Riera-Rodríguez, F., Arana-Cuenca, A., & Téllez-Jurado, A. (2011). Review: production and functionality of active peptides from milk. *Food Science and Technology International*, 17, 293–317.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., & Takano, T. (1995). Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Dairy Science*, 78, 1253–1257.
- Nielsen, M. S., Martinussen, T., Flambar, B., Sorensen, 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, 155–165.
- Ohsawa, K., Satsu, H., Ohki, K., Enjoh, M., Takano, T., & Shimizu, M. (2008). Producibility and digestibility of antihypertensive beta-casein tripeptides, Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro, in the gastrointestinal tract: analyses using an in vitro model of mammalian gastrointestinal digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 854–858.
- Perdigón, G., Alvarez, S., & Pesce de Ruiz Holgado, A. (1991). Immuno-adjunct activity of oral *Lactobacillus casei*: influence of dose on the secretory immune response and protective capacity in intestinal infections. *Journal of Dairy Research*, 58, 485–496.
- Quirós, A., Contreras, M. M., Ramos, M., Amigo, L., & Recio, I. (2009). Stability to gastrointestinal enzymes and structure-activity relationship of β -casein-peptides with antihypertensive properties. *Peptides*, 30, 1848–1853.
- Raha, S., Dosquet, C., Abgrall, J. F., Jollès, P., Fiat, A. M., & Caen, J. P. (1988). KRDS a tetrapeptide derived from lactotransferrin inhibits binding of monoclonal antibody against glycoprotein IIb-IIIa on ADP-stimulated platelets and megakaryocytes. *Blood*, 72, 172–178.
- Robert, M. C., Razaname, A., Mutter, M., & 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., Syväoja, E. L., Tuominen, J., & Korhonen, H. (1997). Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of *Lactobacillus GG* fermented UHT milk. *Milchwissenschaft*, 52, 675–678.
- Rutherford, K. J., & Gill, H. S. (2000). Peptides affecting coagulation. *British Journal of Nutrition*, 84, S99–102.
- Saito, T. (2008). Antihypertensive peptides derived from bovine casein and whey proteins. In Bösze, Z. (Ed.), (2008). *Advances in experimental medicine and biology: Bioactive components of milk*, Vol. 606 (pp. 295–317). New York, USA: Springer.
- Sandre, C., Gleizes, A., Forestier, F., Gorges-Kergot, R., Chilmonczyk, S., Leonil, J., et al. (2001). A peptide derived from bovine β -casein modulates functional properties of bone marrow-derived macrophages from germ free and human flora-associated mice. *Journal of Nutrition*, 131, 2936–2942.
- Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 394–406.
- Schägger, H., & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166, 368–379.
- Shah, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17, 1262–1277.
- Silva, S. V., & Malcata, F. X. (2005). Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15, 1–15.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., & Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92, 357–366.
- Yamamoto, N., Akino, A., & Takano, T. (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 77, 917–922.
- Yang, W. G., Wang, Z., & Xu, S. Y. (2007). A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysate by microplate reader. *Chinese Chemical Letters*, 18, 449–451.
- Zhang, S. B., Wang, Z., & Xu, S. Y. (2008). Antioxidant and antithrombotic activities of rapeseed peptides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, 521–527.

México, D. F. a 29 de noviembre de 2012.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

Péptidos bioactivos de suero de leche y caseínas liberados por la actividad proteolítica de *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*.

Que presentó

M.B. María Rebeca Rojas Ronquillo

Director:

Dr. J. Mariano García Garibay



Jurado:

Dra. Lilia Arely Prado Barragán (Presidente)



Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero (Secretario)



Dra. Gabriela Mariana Rodriguez Serrano



Dra. Carmen Wachter Rodarte

