

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ELABORACIÓN DE QUESO COTTAGE ADICIONADO DE
PROBIÓTICOS Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIHIPERTENSIVA DE LOS PÉPTIDOS GENERADOS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

MARICARMEN PÉREZ LÓPEZ

DIRIGIDA POR

Dra. SILVIA LORENA AMAYA LLANO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2010.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ELABORACIÓN DE QUESO COTTAGE ADICIONADO DE
PROBIÓTICOS Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIHIPERTENSIVA DE LOS PÉPTIDOS GENERADOS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

MARICARMEN PÉREZ LÓPEZ

DIRIGIDA POR

Dra. SILVIA LORENA AMAYA LLANO

SINODALES

Dra. SILVIA LORENA AMAYA LLANO
DIRECTOR

Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ
SINODAL

Dr. EDUARDO CASTAÑO TOSTADO
SINODAL

Dra. ANABERTA CARDADOR MARTÍNEZ
SINODAL

**Dedicada a mis queridos
papás y hermanos
con todo mi Amor**

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Alimentos funcionales	3
II.2 Probióticos	3
II.3 Quesos como vehículo de probióticos	4
II.4 Proteínas de la leche	5
II.5 Péptidos de la leche	6
II.6 Producción de péptidos bioactivos	7
II.6.1 Digestión enzimática	7
II.6.2 Fermentaciones de la leche con cultivos proteolíticos iniciadores	8
II.6.3 Proteólisis por enzimas derivadas de microorganismos	9
II.7 Producción de péptidos bioactivos por BAL en quesos	10
II.8 Péptidos con actividad antihipertensiva	14
II.9 Actividad de la ACE. Relación estructura/actividad de los péptidos inhibidores de la ACE	15
II.10 Péptidos inhibidores de la ACE en quesos	17
II.11 Quesos en México	19
II.11.1 Queso Cottage	19
III. HIPÓTESIS	21
IV. OBJETIVOS	22
IV.1 GENERAL	22
IV.2 ESPECÍFICOS	22

V. METODOLOGÍA	23
V.1 Material	23
V.2 Métodos	23
V.2.1 Preparación de cepas probióticas	23
V.2.2 Elaboración de queso Cottage control y probiótico	24
V.2.3 Extractos de queso solubles en agua	25
V.2.4 HPLC en fase reversa del extracto de queso soluble en agua	25
V.2.5 Estimación del tamaño molecular de los péptidos generados en el queso por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)	25
V.2.6 Evaluación de la inhibición de la ACE en el extracto de queso soluble en agua de los péptidos generados por las bacterias probióticas	27
V.2.7 Diseño y análisis estadísticos	29
VI. RESULTADOS	30
VI.1 Identificación de péptidos bioactivos en queso Cottage mediante HPLC en fase reversa	30
VI.2 Estimación del tamaño molecular de los péptidos generados en el queso por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)	34
VI.3 Evaluación de la inhibición de la ACE en el extracto de queso soluble en agua	36
VII.DISCUSIÓN	37
VII.1 Identificación de péptidos bioactivos en queso Cottage mediante HPLC en fase reversa	37
VII.2 Estimación del tamaño molecular de los péptidos generados en el queso por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)	38
VII.3 Evaluación de la inhibición de la ACE en el extracto de queso soluble en agua	39
VIII.CONCLUSIONES	41
IX. BIBLIOGRAFÍA	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Péptidos bioactivos liberados de proteínas lácteas por varios microorganismos y enzimas microbianas.	11
2 Péptidos bioactivos identificados en diferentes tipos de quesos.	13
3 Cantidad de cada uno de los reactivos empleados para la preparación de geles de acrilamida mediante el sistema TRIS-GLICINA.	26
4 Tiempo en minutos en el que deben estar sumergidos los geles de acrilamida en cada una de las soluciones de la tinción rápida con plata.	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Sistemas renina-angiotensina y quinina-caliceína. Acción de la ACE.	16
2	Gráfico seminormal de la interacción del tiempo de almacenamiento respecto al tipo de bacteria probiótica adicionada al queso.	30
3	Comparación en el número de picos generados entre el queso control y los quesos probióticos.	31
4	Perfil cromatográfico de los péptidos de los extractos de queso solubles en a 14 días de almacenamiento en refrigeración a 8°C.	32
5	Perfil cromatográfico de los péptidos de los extractos de queso solubles en agua a 28 días de almacenamiento en refrigeración a 8°C.	33
6	Separación de proteínas y péptidos en electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) del queso control y los quesos probióticos a 2 días de almacenamiento en refrigeración a 8°C.	34
7	Separación de proteínas y péptidos en electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) del queso control y los quesos probióticos a 14 y 28 días de almacenamiento en refrigeración a 8°C.	35

- 8 Porcentaje de inhibición de la ACE de los extractos de queso solubles en agua correspondientes al queso control y a los quesos probióticos a 2,14 y 28 días de almacenamiento en refrigeración a 8°C.

36

RESUMEN

Las proteínas lácteas poseen propiedades nutricionales, funcionales y biológicas, las cuales son parcialmente atribuidas a los péptidos inactivos dentro de la secuencia de la proteína que pueden ser liberados por acción de enzimas proteolíticas nativas de la leche, enzimas de bacterias ácido lácticas, cultivos iniciadores o de fuentes exógenas, durante la digestión gastrointestinal o el procesamiento del alimento. Los péptidos han mostrado poseer varias propiedades bioactivas como: antihipertensiva, antimicrobiana, inmunomoduladora, entre otras. En este estudio se elaboró un queso fresco tipo Cottage con adición de bacterias probióticas y se determinó la actividad antihipertensiva de los péptidos generados. Se prepararon cuatro tratamientos; queso control sin adición de probióticos, queso con adición de una mezcla comercial de bacterias probióticas Yomix[®] 205, queso con adición de *Lactobacillus casei* y queso con adición de *Lactobacillus rhamnosus*, cada tratamiento se preparó por triplicado y se almacenó a 8°C para la posterior obtención de los extractos de queso solubles en agua a los 2,14 y 28 días de almacenamiento. Con los extractos de queso solubles en agua se determinó el perfil peptídico de los quesos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa; el mayor número de picos se obtuvo en el queso probiótico con adición de *Lactobacillus casei*. Con electroforesis desnaturizante se observó que la proteólisis de *Lactobacillus casei* fue mayor en comparación con el resto de los quesos probióticos y el queso control. Finalmente de los extractos de queso solubles en agua se evaluó la actividad antihipertensiva de los péptidos a través de la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ACE); el queso con adición de *Lactobacillus rhamnosus* presentó el mayor porcentaje de inhibición de la enzima con un valor del 45% que se mantuvo constante durante 14 días de almacenamiento.

I. INTRODUCCIÓN

La evolución de los hábitos nutricionales ha sido muy variable a través del tiempo, pero siempre soportada con el criterio básico de mantener la salud. Cada día las exigencias de los consumidores se dirigen más a la búsqueda de nuevos productos con propiedades funcionales que puedan proporcionar además del valor nutritivo, otros componentes biológicamente activos que permitan un mejor estado tanto físico como mental, reduciendo así el riesgo de enfermedades y alargando la vida al mismo tiempo que mantengan su calidad. Es por esto que actualmente se están descubriendo atributos funcionales en muchos alimentos tradicionales y a su vez, desarrollando nuevos productos alimenticios con componentes benéficos a la salud.

Los probióticos son el ejemplo mejor caracterizado y más estudiado de alimentos funcionales y se definen como suplementos microbianos vivos que pueden aportar al organismo beneficios para la salud cuando la bacteria permanece viable en el alimento y hasta su consumo si es ingerido en niveles de al menos 10^7 células viables por gramo o mililitro del producto.

Un gran número de productos alimenticios entre los que destacan el yogurt, productos lácteos fermentados congelados, leche en polvo, helados y jugos de frutas son empleados como vehículo para la adición y consumo de bacterias probióticas, siendo las leches fermentadas y el yogurt los productos más empleados, sin embargo, algunas cepas probióticas presentan inestabilidad en este tipo de alimentos debido a las condiciones típicas que presentan como niveles de pH bajos, condiciones aeróbicas durante su producción y empaque, presencia de peróxido de hidrógeno y la inhibición de sustancias producidas por las bacterias iniciadoras lo que conlleva a la disminución del número de bacterias probióticas viables en el producto final.

Una alternativa para mantener la viabilidad de las bacterias probióticas es su incorporación en productos como los quesos donde el pH, la consistencia, el contenido de grasa, el nivel de oxígeno y las condiciones de almacenamiento son

más adecuados para la supervivencia de este tipo de microorganismos durante el procesamiento y la digestión. Se han empleado diferentes tipos de quesos como vehículos para probióticos, dentro de los cuales se encuentra el queso tipo Cottage y quesos de tipo Continental y Cheddar, ya que estos tipos habituales de quesos presentan condiciones favorables para las bacterias probióticas.

Durante el almacenamiento del queso ocurren una serie de reacciones bioquímicas ó cambios metabólicos en las que se incluyen la glucólisis, lipólisis y la más importante: la proteólisis. La proteólisis en quesos es catalizada por proteinasas y peptidasas provenientes de diversas fuentes incluidas enzimas nativas de la leche, enzimas coagulantes, bacterias ácido lácticas iniciadoras y no iniciadoras, así como los probióticos adjuntos. La actividad de estas enzimas hidroliza las proteínas lácteas contenidas en la matriz del queso provocando la liberación directa de péptidos bioactivos, los cuales se definen como secuencias de aminoácidos inactivas en el interior de la proteína precursora, pero que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación. Generalmente, los péptidos bioactivos contienen de 3 a 20 residuos de aminoácidos por molécula, liberados durante el procesamiento industrial de los alimentos o bien, durante la digestión gastrointestinal.

Las actividades descritas hasta la actualidad para estos péptidos son diversas, e incluyen la actividad opioide, antihipertensiva, antimicrobiana, antitrombótica y quelante de minerales, entre otras.

Debido a la relación causa/efecto existente entre la hipertensión, en los últimos años, los estudios se han centrado en la búsqueda de péptidos con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y en el consecuente empleo de dichos péptidos como ingredientes de alimentos funcionales encaminados a la prevención de la hipertensión.

En este proyecto se llevó a cabo la incorporación de microorganismos probióticos a una matriz sólida proteica como lo es un queso para el estudio del metabolismo de estos microorganismos como un medio para la obtención de péptidos bioactivos con actividad inhibitoria de la ACE.

II. ANTECEDENTES

II.1 Alimentos funcionales

La nutrición actual está enfocada a la prevención de las enfermedades crónicas, donde la dieta y el estilo de vida desempeñan roles fundamentales. Los consumidores están preocupándose cada vez más por su salud y esperan, a través de los alimentos consumidos, alcanzar o mantener su salud y bienestar. La respuesta a esta demanda ha sido el acelerado desarrollo de la industria de los alimentos funcionales, los cuales son alimentos que poseen la característica particular de que algunos de sus componentes afectan funciones del organismo de manera específica y positiva, promoviendo un efecto fisiológico o psicológico más allá de su aporte nutricional clásico. Su efecto adicional puede ser su contribución a mantener la salud y bienestar o la disminución del riesgo a contraer enfermedades.

La producción de estos alimentos, también llamados “saludables”, se ha incrementado notablemente en distintos países (Diplock y col., 1999).

II.2 Probióticos

Los probióticos constituyen uno de los grupos más destacados dentro de los alimentos funcionales. Son microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades suficientes, ejercen un efecto positivo en la salud más allá de los efectos nutricionales básicos (Tuhoy y col., 2003; Charalampopoulos y col., 2002; Betoret y col., 2003).

En la actualidad, a los probióticos se les ha asociado con los siguientes efectos benéficos potenciales: mejoran la digestión de lactosa, reducen la inflamación intestinal, reducen la incidencia de diarrea después del tratamiento con antibióticos, estimulan el sistema inmune, mejoran la resistencia a las infecciones, reducen la incidencia de reacciones alérgicas, protegen contra algunos tipos de cáncer, reducen los niveles de colesterol y la incidencia de enfermedades cardíacas, entre otras (Salminen y col., 2004; Mattila-Sandholm y Saarela, 2003; Ouwehand y col., 2003).

Los principales probióticos son las bacterias integrantes de los géneros *Lactobacillus (Lb)* y *Bifidobacterium*, que son microorganismos que están presentes en el tracto gastrointestinal humano y que han sido, tradicionalmente, utilizadas en diversas fermentaciones alimentarias.

Para que se manifieste el efecto benéfico de las bacterias probióticas, estas deben permanecer viables en el alimento y hasta el tiempo de su consumo presentando niveles de al menos 10^7 células viables por gramo o mililitro del producto (Ishibashi y Shimamura, 1993).

II.3 Quesos como vehículo de probióticos

El yogurt y las leches fermentadas se han utilizado como vehículos para el aporte de probióticos, sin embargo, se ha observado que estos productos no son óptimos para mantener altas concentraciones de algunos microorganismos como las bifidobacterias. Este tipo de alimentos posee un rango bajo de pH y condiciones anaeróbicas las cuales provocan que la sobrevivencia de microorganismos probióticos disminuya durante su vida de anaquel.

Una alternativa para mantener la viabilidad de las bacterias probióticas es su incorporación en productos como los quesos donde el pH, el alto contenido de proteína y grasa, la consistencia sólida, el nivel de oxígeno y las condiciones de almacenamiento confieren cierta protección a las bacterias durante su procesamiento y la digestión (Boylston y col., 2004).

Se han empleado diferentes tipos de quesos como vehículos para probióticos. Dentro de los quesos frescos, Blanchette y col., (1996) prepararon queso Cottage cuyo aderezo cremoso fermentaron con *Bifidobacterium infantis* antes de adicionarlo a la cuajada. Los probióticos sobrevivieron en el queso por períodos de hasta 15 días de almacenamiento, aunque las cuentas para este tiempo ya eran relativamente bajas (10^3 ufc/g). A los 28 días transcurridos ya no se pudieron detectar bifidobacterias vivas.

II.4 Proteínas de la leche

La leche está compuesta principalmente por agua, carbohidratos, lípidos y proteínas, así como por otros constituyentes minoritarios como las enzimas, vitaminas y sales minerales.

Las proteínas se encuentran en una proporción de 30-35 g/L, constituyendo la fracción más compleja de la leche. Existen dos tipos de proteínas lácteas, las caseínas, que representan el 80% y las proteínas de suero (Whitney, 1988). La concentración proteica total, así como la concentración y la secuencia aminoacídica de cada una de las proteínas lácteas dependen de la especie (Storry y col., 1983).

En general, las principales fracciones proteicas de la leche de vaca incluyen α -lactalbúmina (α -LA), β -lactoglobulina (β -LG), caseínas (CN), inmunoglobulinas (Ig), lactoferrina (LF), fracciones de péptido-proteosa (estables al calor), fosfoglicoproteínas (solubles en ácido) y proteínas séricas menores tales como: transferrina y albúmina sérica.

Bajo la denominación de caseínas se incluyen cuatro tipos de cadenas polipeptídicas, α ₁-caseína (α ₁-CN), α ₂-caseína (α ₂-CN), β -caseína (β -CN) y κ -caseína (κ -CN).

Las secuencias de sus estructuras primarias son complejas y muy diferentes a las de otras proteínas, debido al alto contenido de prolina y a las regiones ácidas que incluyen los residuos de fosfoserina (Creamer y MacGibbon, 1996). La conformación secundaria de las caseínas está poco organizada, similar a la estructura de las proteínas globulares desnaturalizadas (Walstra y Jenness, 1987).

La leche contiene también moduladores de funciones gastrointestinales y hemodinámicas, hormonas y factores de crecimiento, además de cumplir con funciones de inmunoregulación como la defensa contra enfermedades y la modulación de la población de microorganismos intestinales (Tomé y Dehabbi, 1998).

II.5 Péptidos de la leche

En los últimos años, el estudio de las proteínas en la dieta como componente fisiológico activo ha incrementado. Las proteínas alimenticias se han reconocido como fuente de péptidos biológicamente activos. Tales péptidos se encuentran en estado inactivo dentro de la molécula proteica y pueden ser liberados durante la digestión enzimática tanto *in vivo* como *in vitro*.

Estos péptidos se definen como secuencias de aminoácidos inactivas en el interior de la proteína precursora, que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación mediante hidrólisis química o enzimática. Generalmente, son péptidos de tamaño pequeño, de 3 a 20 aminoácidos, liberados de las fracciones proteicas mediante proteólisis enzimática (Abubakar y col., 1998; Pihlanto-Leppälä y col., 2000), procesos fermentativos (Yamamoto y col., 1999; Gobbetti y col., 2000) o la combinación de ambos, que tiene lugar durante el procesamiento de alimentos o durante la digestión gastrointestinal (Pihlanto-Leppälä y col., 1998).

Se ha encontrado que los péptidos bioactivos obtenidos de las proteínas de la leche presentan funciones antimicrobianas, inmunomoduladoras, antitrombóticas y de transporte de minerales. También se ha encontrado que son capaces de disminuir la presión sanguínea de sujetos hipertensos y actuar como opioides (FitzGerald y Meisel, 2003).

Los péptidos bioactivos se encuentran en la leche, en leches fermentadas, quesos y sueros derivados de quesería (Roudot-Algaron y col., 1994; Saito y col., 2000; Smacchi y Gobbetti, 1998; Gómez-Ruiz y col., 2002). Las enzimas proteolíticas de la leche, las enzimas provenientes de las bacterias ácido lácticas (BAL) y las provenientes de fuentes exógenas contribuyen a la generación de péptidos bioactivos, prestando particular atención a los péptidos producidos por las proteinasas de las BAL que actúan sobre las proteínas de la leche (Meisel, 1998).

Estudios de péptidos bioactivos provenientes de las proteínas lácteas han sido publicados en años recientes (Schanbacher y col., 1998).

Se le ha dado un énfasis particular al aislamiento de péptidos bioactivos derivados de diferentes tipos de quesos europeos. Últimamente se ha manifestado interés por la caracterización de quesos de origen latinoamericano (Van Hekken y Farkye, 2003), así como en el uso de cultivos lácticos iniciadores en la elaboración de los mismos.

II.6 Producción de péptidos bioactivos

Básicamente los péptidos bioactivos pueden ser generados de las proteínas precursoras de la leche de la siguiente manera:

- Hidrólisis enzimática por enzimas digestivas
- Fermentación de leche con cultivos proteolíticos iniciadores
- Proteólisis por enzimas derivadas de microorganismos

En muchos estudios las combinaciones de los métodos proveen una generación efectiva de péptidos funcionales (Korhonen y Pihlanto-Leppälä, 2003).

II.6.1 Digestión enzimática

La manera más común de producir péptidos bioactivos es a través de la hidrólisis enzimática de las moléculas proteicas enteras.

Muchos de los péptidos bioactivos conocidos se han producido usando enzimas gastrointestinales, usualmente pepsina y tripsina.

Otras enzimas y diferentes combinaciones de proteinasas provenientes de fuentes bacterianas y fúngicas (incluyendo alcalasa, quimiotripsina, pancreatina, pepsina y termolisina) han sido utilizadas también para generar péptidos de varias proteínas (Korhonen y Pihlanto-Leppälä, 2003).

Se han encontrado concentraciones elevadas de caseinofosfopéptidos en particular altas cantidades de α_{s1} -CN f(59-79) por la digestión de las micelas de caseína digeridas sucesivamente con pepsina y tripsina.

II.6.2 Fermentación de leche con cultivos proteolíticos iniciadores

Muchas industrias alimentarias utilizan cultivos lácticos iniciadores que son altamente proteolíticos. Los péptidos bioactivos pueden ser generados por cultivos iniciadores y no iniciadores usados en la manufactura de productos lácteos fermentados. El sistema proteolítico de las BAL por ejemplo *Lactococcus lactis*, *Lb. helveticus* y *Lb. delbrueckii* ssp, del cultivo iniciador y de la flora endógena de la leche consiste en un sistema de proteinasas enlazadas a la pared celular y a un número distinto de peptidasas intracelulares, incluyendo endopeptidasas, aminopeptidasas, tripeptidasas, y dipeptidasas (Christensen y col., 1999; Kunji y col., 1996).

Los avances han hecho posible elucidar la caracterización bioquímica y genética de estas enzimas. El hecho que las actividades de las peptidasas son afectadas por las condiciones de crecimiento hace posible manipular la formación de péptidos (Williams y col., 2002).

Los péptidos liberados durante el proceso de fermentación pueden ejercer distintas actividades biológicas que podrían contribuir a las propiedades benéficas atribuidas a los productos lácteos fermentados y a las propias BAL (Sanders, 1993; Lee y Salminen, 1995).

Algunos de los péptidos liberados tras la acción de los microorganismos durante la fermentación de la leche, pueden ejercer actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), por lo que los productos fermentados podrían ser empleados en la prevención y tratamiento de la hipertensión.

Los péptidos procedentes de los procesos fermentativos difieren en función de las propiedades cualitativas y cuantitativas de las proteínas lácteas de las distintas especies (Fazel, 1998).

Además, la acción de los fermentos es decisiva, por lo que las características del producto final dependerán de la especie y cepa del cultivo iniciador empleada en el proceso de fermentación (Yamamoto, 1997; Matar y col., 1997).

Durante el procesado y el almacenamiento de los productos fermentados, las proteinasas son capaces de hidrolizar las proteínas del alimento a fermentar y generar oligopéptidos (Harwalkar y McMahon, 1993).

Los di-, tri- y oligopéptidos de tamaño pequeño pueden ser transportados, mediante sistemas de transporte específicos de la bacteria, hasta el interior de la célula, donde las peptidasas de la membrana plasmática los hidrolizan formándose péptidos de menor tamaño y aminoácidos libres.

Los péptidos de mayor tamaño que no pueden ser transportados al interior de la célula también pueden ser fuente de péptidos bioactivos tras su degradación por la peptidasas intracelulares liberadas durante la lisis celular (Thomas y Pritchard, 1987; Poolman y col., 1995; Law y Haandrikman, 1997). Los péptidos originados contribuyen, por tanto, al cambio en las propiedades reológicas, sensoriales y biológicas del producto fermentado (Korhonen y col., 1998).

Existe dependencia del grado de proteólisis en función de las especies y cepas de microorganismos empleadas en cada estudio (Marshall y Tamine, 1997), así como de las condiciones del proceso de fermentación.

El Cuadro 1 presenta una lista de estudios experimentales relacionados a la producción de péptidos mediante la fermentación de leche empleando diferentes microorganismos proteolíticos o enzimas proteolíticas derivadas de tales microorganismos.

II.6.3 Proteólisis por enzimas derivadas de microorganismos

La proteólisis es uno de los fenómenos más importantes que contribuyen al sabor y textura de los diferentes tipos de quesos. Los agentes proteolíticos pueden provenir de diferentes fuentes como: coagulantes de la leche, proteinasas nativas de la leche como plasmina y catepsina D, BAL (iniciadoras y no-iniciadoras y sus enzimas); e iniciadores secundarios, por ejemplo, bacterias ácido propiónicas, levaduras, mohos y sus enzimas.

La degradación de las proteínas lácteas por proteasas permite la formación de péptidos y aminoácidos, los cuales actúan como compuestos del sabor. Sin embargo, los péptidos liberados de las proteínas alimentarias durante la fermentación, también tienen importancia en la salud ya que pueden proporcionar numerosas respuestas fisiológicas en el organismo.

Estos péptidos bioactivos pueden ser liberados durante la elaboración o maduración de los productos lácteos por acción de las proteasa y peptidasas microbianas (Ryhänen y col., 2001).

Las BAL son conocidas por poseer una variedad de enzimas proteolíticas capaces de utilizar las proteínas como fuente de nitrógeno para garantizar su crecimiento durante la fermentación (Matar y col., 1996).

El sistema proteolítico de la mayor parte de las BAL consta de una única proteinasa extracelular con actividad caseinolítica, diversos transportadores de aminoácidos, transportadores de di- y tripéptidos y un transportador de oligopéptidos.

El sistema se completa con aminopeptidasas intracelulares que intervienen en el último paso de la degradación (Chistensen y col., 1999), liberándose los aminoácidos esenciales para el desarrollo de las BAL.

II.7 Producción de péptidos bioactivos por BAL en quesos

Los péptidos bioactivos pueden ser liberados durante el proceso de manufactura de productos lácteos. Proteasas provenientes de los mismos alimentos, como plasminas en leche, pueden hidrolizar las proteínas durante el procesamiento y almacenamiento. Varios estudios han reportado que casomorfina, péptidos inhibidores de la ACE y fosfopéptidos se han encontrado en productos lácteos fermentados.

Los productos lácteos tradicionales como quesos y leches fermentadas bajo ciertas condiciones pueden proveer beneficios a la salud cuando son ingeridos diariamente como parte de una dieta.

Cuadro 1. Péptidos bioactivos liberados de proteínas lácteas por varios microorganismos y enzimas microbianas.

Microorganismo usado	Proteína Precursora *	Secuencia peptídica	Bioactividad
<i>Lb. helveticus</i>	β -CN	Val-Pro-Pro	Inhibidores de la ACE
Enzimas de <i>Lactobacillus</i> GG + pepsina y tripsina	β -CN, α_{s1} -CN	Tyr-Pro-Phe-Pro, Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg, Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp	Opioide, inhibidores de la ACE, inmunoestimuladores
Proteinasa <i>Lb. helveticus</i> CP90	β -CN	Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-(Glu)	Inhibidores de la ACE
<i>Lb. helveticus</i> CPN 4	Proteínas del suero	Tyr-Pro	Inhibidores de la ACE
<i>Lb. delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i> SS1 <i>Lc. lactis</i> subesp. <i>cremoris</i> FT4	β -CN, κ -CN	Muchos fragmentos	Inhibidores de la ACE
<i>Lb. delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i> IF013953	κ -CN	Ala-Arg-His-Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met	Antioxidante
<i>Lb. rhamnosus</i> + digestión con pepsina y corolase PP	β -CN	Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe, Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu	Inhibidores de la ACE
<i>Lb. delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i>	β -CN	Ser-Lys-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly, Pro-Ile	Inhibidores de la ACE
<i>Streptococcus thermophilus</i> + <i>Lc. Lactis</i> subesp. <i>Lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	β -CN	Ser-Lys-Val-Tyr-Pro	Inhibidores de la ACE

*Abreviaturas: CN=caseína, ACE=enzima convertidora de angiotensina (Korhonen y Pihlanto-Leppälä, 2006).

Los productos lácteos tradicionales como quesos y leches fermentadas bajo ciertas condiciones pueden proveer beneficios a la salud cuando son ingeridos diariamente como parte de una dieta.

En el Cuadro 2 se enlistan diversos péptidos bioactivos que se han encontrado en diferentes tipos de quesos. Una gran variedad de péptidos son formados durante la maduración de los quesos, muchos de los cuales han demostrado tener actividades biológicas.

Los caseinofosfopéptidos se conocen como constituyentes naturales del queso Cheddar y Comté. Además, la proteólisis secundaria durante la maduración del queso permite la formación de otros péptidos y la presencia de los beneficios de salud parece ser independiente de su estado de maduración.

En un estudio realizado por Meisel y col., (1997) se detectó una alta actividad inhibidora de la ACE en queso Gouda de edad media de maduración comparada con los de corto o largo término de maduración.

Estos resultados sugieren que la concentración de péptidos activos en quesos aumenta durante la maduración pero disminuye cuando la proteólisis excede cierto nivel.

Laffineur y col., (1996) mostraron que las BAL son capaces de liberar péptidos de β -CN con actividad inmunomoduladora.

Un estudio realizado por Pihlanto-Leppälä y col., (1998) mostraron que los cultivos iniciadores de BAL fueron capaces de producir péptidos con actividad inhibitoria de la ACE sólo después de la digestión de la α -LA y la β -LG, con pepsina y tripsina.

Otros péptidos con potente actividad inhibitoria que no habían sido reportados provinieron de la β -CN y de la α_{s1} -CN. En un estudio similar, se detectaron péptidos obtenidos de leche fermentada con *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*, conteniendo la secuencia de β -lactorfina (Belem y col., 1999).

Cuadro 2. Péptidos bioactivos identificados en diferentes tipos de quesos

Tipo de Queso	Péptidos bioactivos identificados*	Bioactividad	Referencia
Parmesano	β -CN f(8-16), f(58-77), α_{s2} -CN f(83-33)	Fosfopéptidos, precursores de β -casomorfina, inhibidores de la ACE	Addeo y col., 1992.
Cheddar	α_{s1} - y fragmentos de β -CN	Varios fosfopéptidos	Singh y col., 1997.
Variedades italianas: Mozzarella, Crescenza, Italiano, Gorgonzola	β -CN f(58-72)	Inhibidores de la ACE	Smacchi y Gobbetti, 1998.
Gouda	α_{s1} -CN f(1-9), β -CN f(60-68)	Inhibidores de la ACE	Meisel y col., 1997; Saito y col., 2000.
Emmental	α_{s1} y fragmentos β -CN	Inmunoestimuladores, varios fosfopéptidos, inhibidores de la ACE	Gaganaire y col., 2001.
Manchego	Ovino α_{s1} , α_{s2} - y fragmentos β -CN	Inhibidores de la ACE	Gómez-Ruiz y col., 2002.

*Abreviaturas: CN= caseína, ACE= enzima convertidora de angiotensina

Recientemente, diferentes tipos de quesos como el Gouda, han sido utilizados como fuente de péptidos con actividad antihipertensiva (Saito y col., 2000; Ryhänen y col., 2001). Sin embargo, son pocos los datos disponibles acerca del papel que desempeñan los diferentes cultivos iniciadores sobre la producción de péptidos bioactivos (Ryhänen y col., 2001).

En el estudio realizado por Gómez-Ruiz y col., (2002) se determinó que la actividad inhibitoria de ACE incrementó con la proteólisis hasta el octavo mes de maduración y empezó a disminuir a los doce meses de maduración del queso Manchego.

En un estudio realizado en queso Emmental se encontró que Catepsina D y proteinasas celulares podrían actuar competitivamente en la degradación de caseínas durante la maduración (Gaganaire y col., 2001). Se señala que además de la acción de las proteinasas nativas de la leche, los lactobacilos termofílicos presentan un rol significativo en la proteólisis del queso a través de la acción de sus proteinasas celulares. Estos microorganismos son considerados la especie bacteriana más activa durante la maduración, no solamente debido a su alta actividad proteolítica, sino también debido a su actividad autolítica.

Este estudio, también informa que algunas regiones de las caseínas no fueron hidrolizadas, aún cuando eran sitios de ruptura potenciales de las diferentes proteinasas de los *Lactobacillus*, lo que podría estar relacionado a la modulación de la especificidad de las enzimas del queso por las condiciones fisicoquímicas (pH, actividad de agua, y contenido de minerales y sales) y a la accesibilidad de los sustratos, debido al rearreglo estructural durante la formación de la matriz caseica y condiciones ambientales en el queso.

II.8 Péptidos con actividad antihipertensiva

La hipertensión arterial es un proceso multifactorial, por lo que los péptidos con actividad antihipertensiva pueden actuar de formas muy diversas, siendo la inhibición de la ACE el mecanismo de acción más estudiado.

Dentro del reino animal, la actividad inhibitoria de la ACE se ha determinado en hidrolizados de gelatina bovina (Kim y col., 2001), de músculo de sardina (Matsufuji y col., 1994; Osajima y col., 1994), de bonito (Matsumura y col., 1993) o de atún (Kohama y col., 1988 y 1991) y en hidrolizados de músculo de gallina (Fujita y col., 2000).

A partir de proteínas aisladas y purificadas, como la α - y γ -zeína, se ha determinado la actividad inhibitoria de la ACE mediante procesos de síntesis (Maruyama y col., 1989a) y procesos hidrolíticos (Miyoshi y col., 1991; Yano y col., 1996). Pero dentro del reino animal, las proteínas más estudiadas como fuente de péptidos inhibidores de la ACE son las proteínas lácteas, principalmente caseínas, tanto bovinas (Maruyama y Suzuki, 1982; Maruyama y col., 1987a) como humanas (Kohmura y col., 1989).

Recientemente, se ha iniciado el estudio de las proteínas de suero y queso como fuente de péptidos con actividad inhibitoria de la ACE (Mullally y col., 1997a y b; Pihlanto-Leppälä, 2001).

II.9 Actividad de la ACE. Relación estructura/actividad de los péptidos inhibidores de la ACE

La ACE (peptidildipéptido hidrolasa) es una enzima multifuncional que está localizada en diferentes tejidos (plasma, pulmón, riñón, corazón, músculo esquelético, páncreas, cerebro) (Nakamura y col., 1995; Maeno y col., 1996; Mullally y col., 1997). Esta enzima actúa en el sistema renina-angiotensina, hidrolizando la angiotensina-I, deca péptido inactivo, de secuencia DNVYIHPFHL, producido por la acción de la renina. La hidrólisis conduce a la liberación de la angiotensina-II y el dipéptido C-terminal Hys-Leu (Skeggs y col., 1956).

La angiotensina-II es un compuesto de elevada potencia vasoconstrictora. Su acción provoca la contracción rápida de las arteriolas, y por tanto, el incremento de la presión arterial.

Además, estimula la secreción de aldosterona por las glándulas suprarrenales, hormona que induce la retención de sodio y agua y la excreción de potasio. La acumulación de agua provoca el incremento del volumen extracelular (Tirelli y col., 1997), el consecuente aumento de la presión arterial y la neutralización de la producción de renina.

La ACE actúa simultáneamente en el sistema quinina-callicreína, catalizando la degradación de las bradiquininas (Érdos, 1975; Soffer, 1976), compuestos de potente acción vasodilatadora. Esta acción favorece el incremento de la presión arterial (Figura 1).

Se ha demostrado que la inhibición de la ACE provoca el descenso de la presión arterial en el hombre y en animales (Laffan y col., 1978).

Se han identificado varios péptidos endógenos que actúan como inhibidores y sustratos competitivos de la ACE, como las encefalinas, las bradiquininas y la sustancia P.

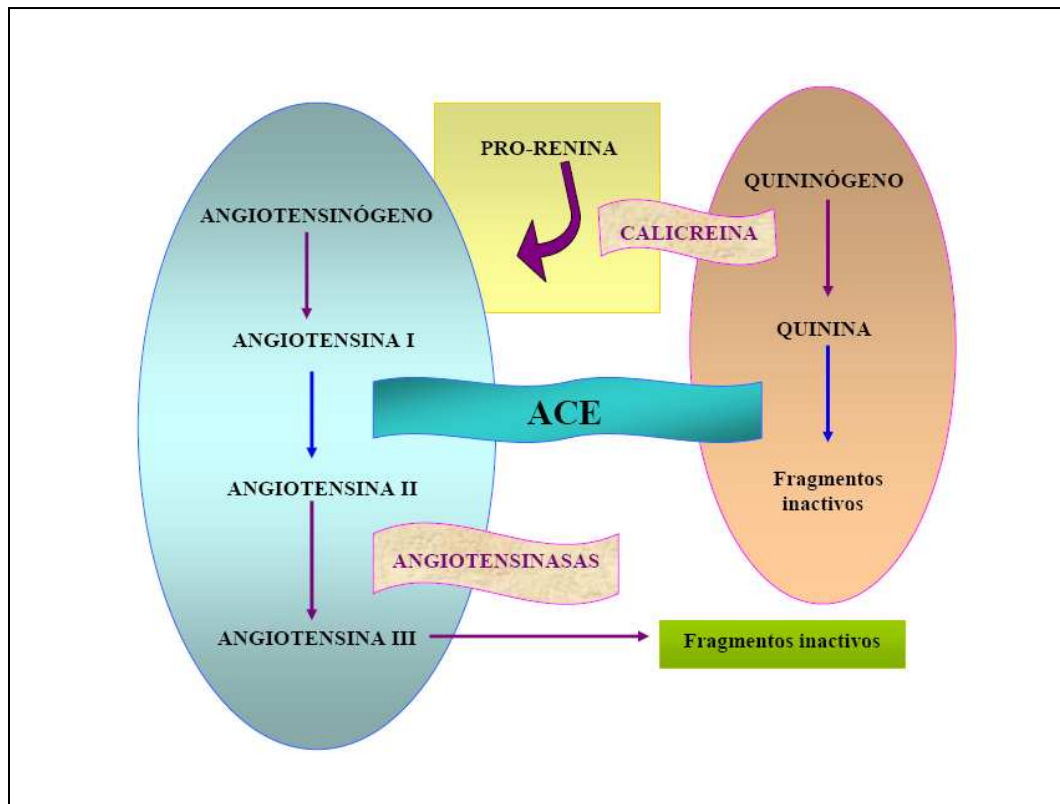


Figura 1. Sistemas renina-angiotensina y quinina-callicreína.

Acción de la ACE (Hernández, 2002).

Se han identificado varios péptidos endógenos que actúan como inhibidores y sustratos competitivos de la ACE, como las encefalinas, las bradiquininas y la sustancia P.

Como primeros inhibidores exógenos se estudiaron los extractos del veneno de la serpiente *Bothrops jararaca*. Estos extractos presentan un doble efecto. Potencian la actividad de la bradiquinina (Ferreira, 1965) e inhiben la ACE, tanto *in vitro* (Bakhle, 1968) como *in vivo* (Ng-Kwai-Hang y Vane, 1970). A partir de estos extractos se han aislado distintos péptidos (Ferreira y col., 1970; Ondetti y col., 1971).

Actualmente, un derivado sintético, el Captopril (D-3- mercapto-2-metilpropanoil-1-prolina; $IC_{50} = 0,006 \mu M$), obtenido tras el estudio del modelo hipotético del sitio activo de la enzima, es el fármaco más empleado en el control de la hipertensión (Unger y col., 1981; Wyvratt y Patchett, 1985).

La unión de los péptidos a la ACE está influida por la secuencia tripeptídica C terminal de los mismos, que puede interaccionar con tres regiones del centro activo de la ACE (Ondetti y Cushman, 1982). Así, los aminoácidos de carácter hidrofóbico, como Triptofano (Trp), Tirosina (Tyr), Fenilalanina (Phe) o Prolina (Pro) favorecen la unión a estas zonas. El péptido con secuencia C-terminal Phe- Alanina (Ala)-Prolina (Pro), análogo al encontrado en el inhibidor presente en el extracto del veneno de serpiente es uno de los más favorables para unirse al centro catalítico.

La carga positiva del grupo guanidino o del grupo ϵ -amino de la Arginina (Arg) o Lisina (Lys), respectivamente, contribuyen a la potencia inhibidora (Cheung y col., 1980). La presencia de aminoácidos dicarboxílicos en la secuencia peptídica o de Pro como penúltimo aminoácido disminuye o anula la actividad inhibitoria de la ACE (Erdős, 1976; Cushman y col., 1977). El extremo N-terminal también influye en la actividad, y así, la presencia de Valina (Val) o de Isoleucina (Ile) en esta posición incrementa la actividad inhibitoria de la ACE en el péptido.

II.10 Péptidos inhibidores de la ACE en quesos

Se han descrito péptidos con distintas actividades biológicas liberados durante el proceso de elaboración del queso, como las casomorfina inmunoreactivas con actividad agonista opiácea e inmunomodulante (Hamel y col., 1985) y los

fosfopéptidos con actividad anticariogénica (Addeo y col., 1992; Roudot-Algaron y col., 1994).

Además, se han encontrado varios péptidos con actividad inhibitoria de la ACE formados durante el proceso proteolítico que tiene lugar durante la maduración del queso.

La especie de la leche de partida, el tipo de cultivo iniciador y las condiciones del proceso de maduración pueden influir en la actividad inhibitoria de la ACE del producto final. Okamoto y col., (1995) han comprobado la actividad inhibitoria de la ACE en quesos maduros como el Camembert, quesos azules y el Cheddar rojo, mientras que en quesos frescos con bajo nivel de proteólisis, como el queso Cottage no encontraron dicha actividad.

Este hecho fue confirmado por Meisel y col., (1997) que, al determinar el porcentaje de inhibición de los extractos solubles en agua y de los extractos ultrafiltrados menores de 1,000 Da de distintos quesos, encontraron porcentajes próximos al 70% en quesos madurados e inferiores al 13 y al 27% en queso fresco y queso Quarg, respectivamente.

La proteólisis que tiene lugar durante el proceso de maduración del queso es el proceso responsable del incremento de la actividad inhibitoria de la ACE hasta un cierto nivel, a partir del cual comienza a disminuir dicha actividad.

Así, la actividad inhibitoria de la ACE en el queso Gouda de 24 meses de maduración fue del 34.6%, mientras que en el de 8 meses fue del 70% (Meisel y col., 1997). Este descenso de la actividad con el tiempo de maduración se había observado durante el aislamiento de péptidos derivados de la α_{s1} -CN, que fue posible en el queso Parmesano de 6 meses de maduración y no pudieron detectarse en el mismo queso de 15 meses de maduración (Addeo y col., 1992).

Estos resultados indican que los péptidos con actividad inhibitoria de la ACE liberados tras la acción de las enzimas proteolíticas de las bacterias lácticas

durante el proceso de maduración, son degradados posteriormente a fragmentos inactivos (Meisel y col., 1997).

II.11 Quesos en México

Según la Norma Oficial Mexicana 121 de la Secretaría de Salud, los quesos son productos elaborados con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado.

Los quesos frescos, se caracterizan por ser productos de alto contenido de humedad, sabor suave y no tener corteza, pudiendo o no adicionarle ingredientes opcionales y tener un periodo de vida de anaquel corto, requiriendo condiciones de refrigeración.

II.11.1 Queso Cottage

El queso Cottage es un queso no madurado, particulado, ligeramente acidificado y elaborado con leche descremada. Contiene un aderezo elaborado con crema cultivada o fresca al cual se le adiciona sal. Entre los rasgos distintivos del producto están su forma granular y su sabor cremoso pese a su bajo contenido graso (Walstra y col., 2006). El producto final tiene al menos 4% de grasa y menos de 80% de humedad para el caso de un producto entero. El queso cottage bajo en grasa debe contener entre 0.5 y 2% de grasa y más de 82.5% de humedad (Kosikowski, 1982). En la mayoría de los productos fermentados, el punto final de la fermentación es un factor decisivo en la calidad final del producto (St-Gelais, y col., 1995). Varios autores han reportado que es importante la correcta determinación

del tiempo “óptimo” de corte para maximizar la textura, homogeneidad y rendimiento del producto (Payne y col., 1993; Crofcheck y col., 1999).

La firmeza en este tipo de queso depende primeramente del pH y en menor grado de la acción de la renina si ésta es usada (Walstra y col., 2001). Por esta razón, durante la manufactura del queso cottage, el tiempo de corte usualmente es determinado por el pH alcanzado. El corte al pH adecuado es el factor más importante en la producción de un queso cottage de alta calidad (Crofcheck y col., 1999). Generalmente, la acidificación se lleva a cabo en un rango de pH de 4.6 a 4.8. Si la cuajada se corta a pH cercano a 4.8, los granos son inicialmente frágiles pero adquieren firmeza cuando son cocinados.

Cuando el corte se realiza a valores menores de pH a 4.6, su contenido de humedad y fragilidad se incrementan y hay un exceso de finos (Emmons y Beckett, 1984). Cuando no se utiliza renina, la cuajada está lista para ser cortado a pH de 4.6. Si se emplea una pequeña cantidad de enzima, ésta influye en la coagulación de la leche debido a la hidrólisis de la k-caseína resultando en una coagulación a un pH más elevado y ocurriendo más pronto que en la ausencia de la renina.

El tiempo de proceso también es importante en la manufactura de queso cottage de alta calidad. En la industria, son ampliamente utilizados tres métodos de procesamiento: corto, medio y largo, para la producción de este tipo de queso (Walstra y col., 2001). La principal diferencia entre dichos métodos es la temperatura de coagulación y la concentración de los cultivos empleados.

En este estudio se elaboró un queso fresco tipo Cottage con adición de microorganismos probióticos y la evaluación de la actividad antihipertensiva de los péptidos generados.

III. HIPÓTESIS

La adición de cepas probióticas a un queso fresco tipo Cottage puede generar péptidos con actividad antihipertensiva.

IV. OBJETIVOS

IV.1 GENERAL

Elaborar un queso fresco tipo Cottage adicionado con probióticos y determinar la actividad antihipertensiva de los péptidos generados.

IV.2 ESPECÍFICOS

- Identificar la producción de péptidos bioactivos en queso Cottage mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en fase reversa.
- Estimar el tamaño molecular de los péptidos bioactivos mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE).
- Evaluar la actividad inhibitoria de la ACE en el extracto de queso soluble en agua de los péptidos generados por las bacterias probióticas durante el almacenamiento del queso.

V. METODOLOGÍA

V.1 Materiales

En la elaboración del queso Cottage se utilizó el cultivo iniciador mesófilo Danisco[®] MA 4001 constituido por las cepas *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus diacetylactis* y *Streptococcus thermophilus*.

Las cepas probióticas empleadas fueron *Lb. casei* 373 y *Lb. rhamnosus* GG 53103 las cuales corresponden a la colección de cultivos tipo americano (ATTC) y fueron proporcionadas por el Dr. Michael J. Miller del Departamento de Ciencia en Alimentos y Nutrición Humana de la Universidad de Illinois.

Se utilizó la mezcla comercial de bacterias probióticas Yomix[®] 205.

V.2 Métodos

V.2.1 Preparación de cepas probióticas

Las dos cepas probióticas fueron propagadas en 3 mL de caldo De Man Rogosa Sharpe (MRS) estéril y fueron incubadas a 37°C por 24 hrs. Posteriormente, se estriaron en agar MRS y se incubaron a 37°C por 24 hrs, transcurrido este tiempo se seleccionaron colonias aisladas las cuales fueron inoculadas en la superficie de tubos que contenían 3 mL de agar infusión cerebro y corazón (BHI) y se dejaron crecer por 24 hrs. Posteriormente, fueron conservadas en refrigeración hasta el momento que se requirieron. A estas colonias se les realizaron las pruebas de confirmación necesarias como tinción de Gram y catalasa.

Posteriormente, las cepas probióticas conservadas en refrigeración se propagaron en 3 mL de leche descremada reconstituida estéril (LDR) al 12% por 24 hrs, y llevaron a cabo dos resiembras, a esta leche fermentada que contenía aproximadamente 8 log₁₀ ufc/mL, se le realizaron diluciones decimales hasta obtener aproximadamente 4 log₁₀ ufc/mL, de esta dilución se tomó 1 mL y se adicionó a 9 mL de LDR, posteriormente se incubó a 37°C por 24 hrs y se obtuvo una curva de crecimiento obteniendo aproximadamente 8 log₁₀ ufc/mL.

V.2.2 Elaboración de queso Cottage control y probiótico

La leche entera se calentó hasta alcanzar una temperatura de 40°C, se descremó, se pasteurizó a 65°C por 30 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se le adicionó cloruro de calcio (20 g por 100 L), el cultivo iniciador Danisco® MA 4001 al 1% y la enzima coagulante de origen microbiano al 10% de lo recomendado por el fabricante (1.2 mL por 75 L de leche). A continuación se incubó la leche a temperatura ambiente de 12 a 14 hrs hasta alcanzar un pH de 4.6.

Después de la coagulación, se cortó la cuajada, se dejó reposar 30 minutos y se cocinó elevando la temperatura lentamente (aproximadamente 1.7°C cada 10 minutos) hasta alcanzar una temperatura entre 50 y 55°C. Posteriormente, se drenó el suero y la cuajada se lavó con baños de agua fría a 29, 15 y 4°C. Finalmente, se escurrió la cuajada hasta eliminar la mayor cantidad de suero.

El aderezo se preparó mezclando leche entera (aproximadamente 3.5% de grasa) con la crema obtenida previamente (aproximadamente 65% de grasa), se estandarizó hasta un 18 % de grasa, se adicionó 4% de cloruro de sodio (sal común) y se homogeneizó dos veces. Posteriormente, este aderezo se pasteurizó a una temperatura de 74°C por 30 minutos, transcurrido este tiempo se llevó a la cámara de refrigeración para su conservación hasta su mezclado con la cuajada (Kosikowsky, 1982).

Para el queso probiótico se mezcló la leche previamente fermentada con las bacterias probióticas en una proporción 1:10 con el aderezo recién preparado y este a su vez fue mezclado con la cuajada obtenida en una proporción de 1 parte de aderezo con o sin probióticos y 3 partes de cuajada. Se prepararon cuatro tratamientos; queso control, queso con adición de una mezcla comercial de bacterias probióticas Yomix® 205, queso con adición de *Lb. casei* y queso con adición de *Lb. rhamnosus*. Cada tratamiento se preparó por triplicado y se almacenó en refrigeración a 8°C para su posterior determinación de sobrevivencia y crecimiento de las bacterias probióticas en el queso, así como el tratamiento adecuado para la obtención de EQSA a los 2, 14 y 28 días de almacenamiento.

V.2.3 Extractos de queso solubles en agua (EQSA)

Fue usado el procedimiento descrito por Kuchroo y Fox, (1982) para obtener los EQSA: 20 g de queso con 40 mL de agua destilada fue homogeneizado durante 1 minuto con un ultra-turrax T-25 basic IKA[®]-Werke a 13,000 g. El homogeneizado se mantuvo a 40°C por una hora y posteriormente fue centrifugado a 3000 g por 20 minutos a 4°C. La capa grasa fue removida y el sobrenadante fue filtrado al vacío, posteriormente se liofilizó y almacenó a -20°C.

V.2.4 HPLC en fase reversa del extracto de queso soluble en agua (EQSA)

El perfil de péptidos de los EQSA se detectó en un HPLC en fase reversa equipado con detector de arreglo de diodos UV-VIS. La separación se llevó a cabo en una columna C18 y se realizó a temperatura ambiente usando una fase móvil de solventes con un flujo de 0.75 mL/minuto. El eluyente A fue una solución al 10% de acetonitrilo conteniendo 0.05 % de ácido trifluoroacético en agua grado HPLC y el eluyente B fue una solución al 60% de acetonitrilo conteniendo 0.05% de ácido trifluoroacético, ambos eluyentes se filtraron con membrana Millipore Type HA 0.45 µm. Se aplicó un gradiente lineal de 0 a 80% de eluyente B por 110 minutos.

Se tomaron muestras de 40 mg de cada uno de los EQSA liofilizados y se diluyeron en 1 mL del solvente A, posteriormente se centrifugaron a 10,000 g por 20 minutos a 4°C, el sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana Millipore Type HA 0.45 µm y del filtrado se tomó una alícuota de 10 µL la cual se inyectó en el sistema de HPLC Agilent 1200. La absorbancia del eluido se midió a 215 nm.

V.2.5 Estimación del tamaño molecular de los péptidos generados en el queso por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)

La degradación de las caseínas en el queso control sin adición de probióticos y en los quesos probióticos se siguió mediante la técnica de electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) de Laemmli, (1970). Para el análisis se utilizó una cámara de electroforesis mini vertical Hoefer SE 250.

El gel concentrador se preparó a una concentración de 4% y el gel separador a una concentración del 15% de acrilamida, ambos geles fueron preparados como se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Cantidad de cada uno de los reactivos empleados para la preparación de geles de acrilamida mediante el sistema TRIS-GLICINA

Reactivo	Gel Concentrador (5 ml) ^a	Gel Separador (10 ml) ^a
Agua Destilada (mL)	3	2.4
Amortiguador del Gel ^b (mL)	1.25	2.5
Acrilamida:bisacrilamida 30:0.8 (mL)	0.7	5
SDS (μL)	40	100
Persulfato de Amonio (μL)	25	50
TEMED (μL)	5	5

^a Volumen requerido para dos geles

^b Gel concentrador: buffer Tris-HCl 0.5M, pH 6.8
Gel separador: buffer Tris-HCl 1.5M, pH 8.8

Se pesaron 10 mg de cada una de las muestras de EQSA liofilizados, se disolvieron en 200 μL de buffer Tris/EDTA pH 7.5, se tomaron 20 μL de cada solución y se adicionaron a 20 μL de buffer de muestra 2X, se calentaron durante 90 segundos en agua hirviendo e inmediatamente se colocaron en hielo.

Como estándar de peso molecular se utilizó un marcador de bajo peso molecular (1.4 a 26.6 kDa) (Cat. 161-0326, Bio-Rad, Hércules, USA), el cual se preparó tomando una alícuota de 2 μL del estándar al cual se le adicionaron 2 μL de buffer de muestra 2X, se calentó a 95°C por 5 minutos e inmediatamente se enfrió en hielo. Se cargaron 2 μL del estándar de peso molecular y 10 μL de cada una de las muestras de EQSA liofilizado en cada carril. Las muestras se corrieron a 20 mA por gel por aproximadamente 50 minutos.

La tinción de las bandas de proteína se llevó a cabo por la técnica de tinción rápida con plata (Ausubel y col., 2002). Los geles fueron colocados en 50 mL de cada una de las soluciones necesarias por el tiempo indicado en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Tiempo en minutos en el que deben estar sumergidos los geles de acrilamida en cada una de las soluciones de la tinción rápida con plata

Solución	Tiempo (minutos)
Agua destilada	10
Solución fijadora	10
Agua destilada (2 veces)	5 (c/u)
Tiosulfato de sodio (0.2 g/L)	1
Agua destilada (2 veces)	20 segundos (c/u)
Nitrato de plata 0.1% (w/v)	10
Solución reveladora	~ 1
Acido cítrico 2.3 M, para detener la aparición de las bandas	10
Agua destilada	10
Solución de secado	10

Al final, las bandas de proteína de las muestras se compararon contra el estándar de peso molecular.

V.2.6 Evaluación de la inhibición de la ACE en el extracto de queso soluble en agua de los péptidos generados por las bacterias probióticas

La actividad Inhibitoria de la ACE se determinó mediante el método espectrofotométrico de Cushman y Cheung, (1971) con modificaciones. Se prepararon 100 mL de buffer de 50mM de sal de HEPES con 300mM de cloruro de sodio al cual se le ajustó el pH a 8.3 a 37°C con HCl 1M, con este buffer se preparó una solución al 0.3% de hipuril-histidil-leucina (HHL) (Sigma).

Se preparó una solución de la ACE (de pulmón de conejo, Sigma) conteniendo 0.33 unit/mL.

El inhibidor de la ACE se preparó pesando 1mg del EQSA del queso control y los quesos probióticos y se disolvió en 1 mL de agua destilada.

En un tubo de ensayo se colocaron 0.20 mL de la solución al 0.3% de HHL y 0.264 mL del inhibidor de la ACE, en tubos separados se prepararon los blancos correspondientes al 0 y 100 % de actividad de la ACE los cuales contenían 0.20 mL de la solución al 0.3% de HHL más 0.25 mL de HCL 1M y 0.20 mL de la solución al 0.3% de HHL, respectivamente. Posteriormente, se agitaron en un vórtex Thermolyne Type 37600 Mixer y a continuación se estabilizaron a 37°C en un termobañó TERLAB por 5 minutos.

Transcurrido este tiempo se adicionaron 0.05 mL de la solución de la ACE para iniciar la reacción, se agitaron en el vórtex e incubaron en el termobañó a 37°C por 15 minutos. Posteriormente, se adicionaron 0.25 mL de HCl 1M para detener la reacción y se agregaron 2 mL de acetato de etilo (Sigma) para extraer el ácido hipúrico liberado por la ACE, se agitaron vigorosamente durante 60 segundos y se dejaron reposar para obtener la separación de fases. Se tomó 1 mL de la fase orgánica de cada tubo, se colocó en un vial y se introdujo a una estufa WTB-Binder a 80°C hasta evaporar completamente el líquido.

Posteriormente, se agregaron 3 mL de agua destilada, se mezcló por inversión hasta disolver el residuo y se transfirió a una celda de cuarzo para su medición en un espectrofotómetro Genesys™ 2 a una longitud de onda de 228 nm.

La actividad de inhibición de la ACE de cada muestra y los blancos se determinó por duplicado.

Cálculos:

$$\begin{array}{l} \text{Unidades/mL} \\ \text{de la ACE} \end{array} = \frac{(A_{228\text{nm}} \text{ blanco } 100\% \text{ de actividad} - A_{228\text{nm}} \text{ blanco } 0\% \text{ de actividad}) (2) (3)}{(9.8) (15) (0.91) (0.05)}$$

donde:

2 = Factor de conversión ya que sólo se detecta la mitad del ácido hipúrico del total producido en el ensayo.

3 = Volumen total de la solución de ácido hipúrico

9.8 = Coeficiente milimolar del ácido hipúrico a 228 nm.

15 = Tiempo en minutos

0.91 = Eficiencia de extracción del acetato de etilo

0.05 = Volumen usado en mL de la ACE

V.2.7 Diseño y análisis estadístico

El diseño experimental para el queso fue un bifactorial, siendo los dos factores de estudio el tiempo de almacenamiento y la bacteria probiótica adicionada. Se utilizó una réplica de los EQSA de cada tratamiento a los diferentes tiempos de almacenamiento en la determinación del perfil peptídico de los quesos mediante HPLC y en la estimación del tamaño molecular de los péptidos en electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE), mientras que en la evaluación de la inhibición de la ACE en el EQSA de los péptidos generados por las bacterias probióticas se utilizaron 2 réplicas. Los resultados se analizaron en el paquete estadístico JMP versión 7 utilizando la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

VI. RESULTADOS

VI.1 Identificación de péptidos bioactivos en queso Cottage mediante HPLC en fase reversa

En la figura 2 se observa el efecto significativo ($\alpha = 0.05$) sobre el número de picos debido al cambio del tipo de bacteria probiótica adicionada al queso; *Lb. casei* presentó mayor número de picos en comparación con el queso control y el resto de los quesos probióticos.

No se observa efecto del tiempo de almacenamiento en la generación del número de picos, así como tampoco interacción entre el tiempo de almacenamiento con el tipo de bacteria probiótica adicionada al queso.

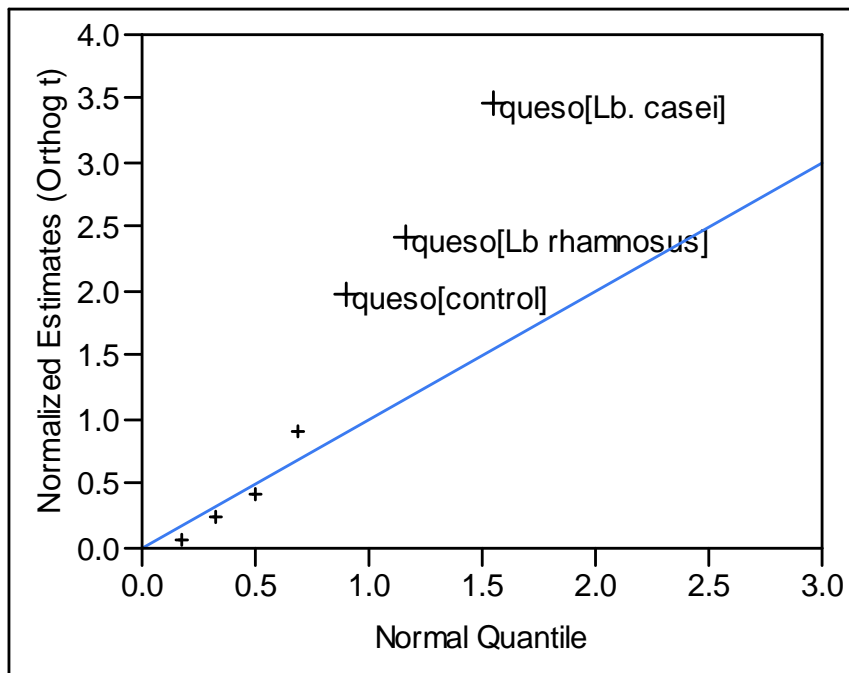


Figura 2. Gráfico seminormal de la interacción del tiempo de almacenamiento respecto al tipo de bacteria probiótica adicionada al queso.

De acuerdo a lo observado en la Figura 3 el queso con adición de *Lb. casei* fue el que presentó mayor número picos, seguido del queso con adición de *Lb. rhamnosus* y el queso con adición de la mezcla comercial de bacterias probióticas Yomix® 205. El queso control mostró el menor número de picos.

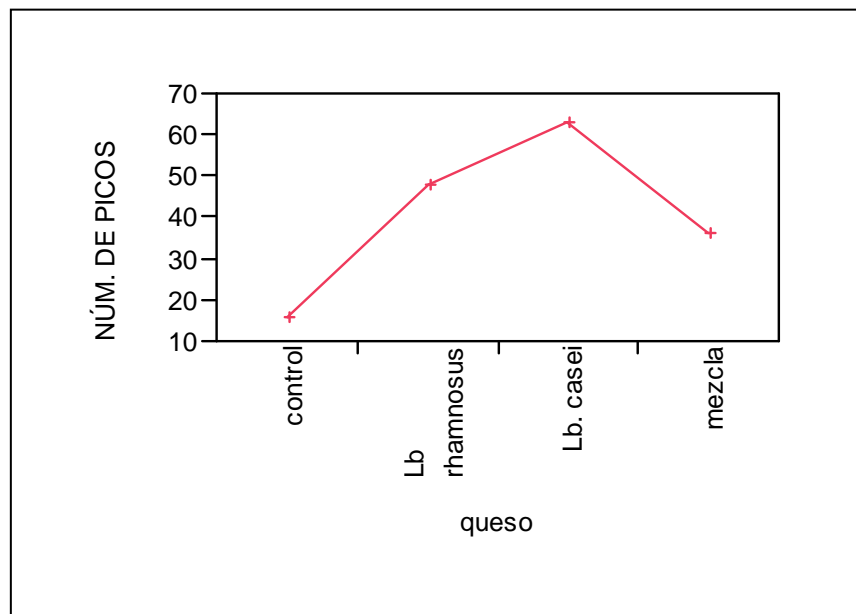


Figura 3. Comparación en el número de picos generados entre el queso control y los quesos probióticos.

En la Figura 4 se muestra el perfil peptídico de los EQSA del queso control (1), queso con adición de una mezcla comercial de bacterias probióticas Yomix® 205 (2), queso con adición de *Lb. casei* (3) y queso con adición de *Lb. rhamnosus* (4) a 14 días de almacenamiento en refrigeración a 8°C; se observa que existió diferencia en el número de picos generados por el queso control y los quesos probióticos de los cuales *Lb. casei* fue el que presentó el mayor número de picos seguido de *Lb. rhamnosus* y el queso con adición de la mezcla comercial de bacterias probióticas

La misma tendencia se presentó a los 28 días de almacenamiento como se muestra en la Figura 5.

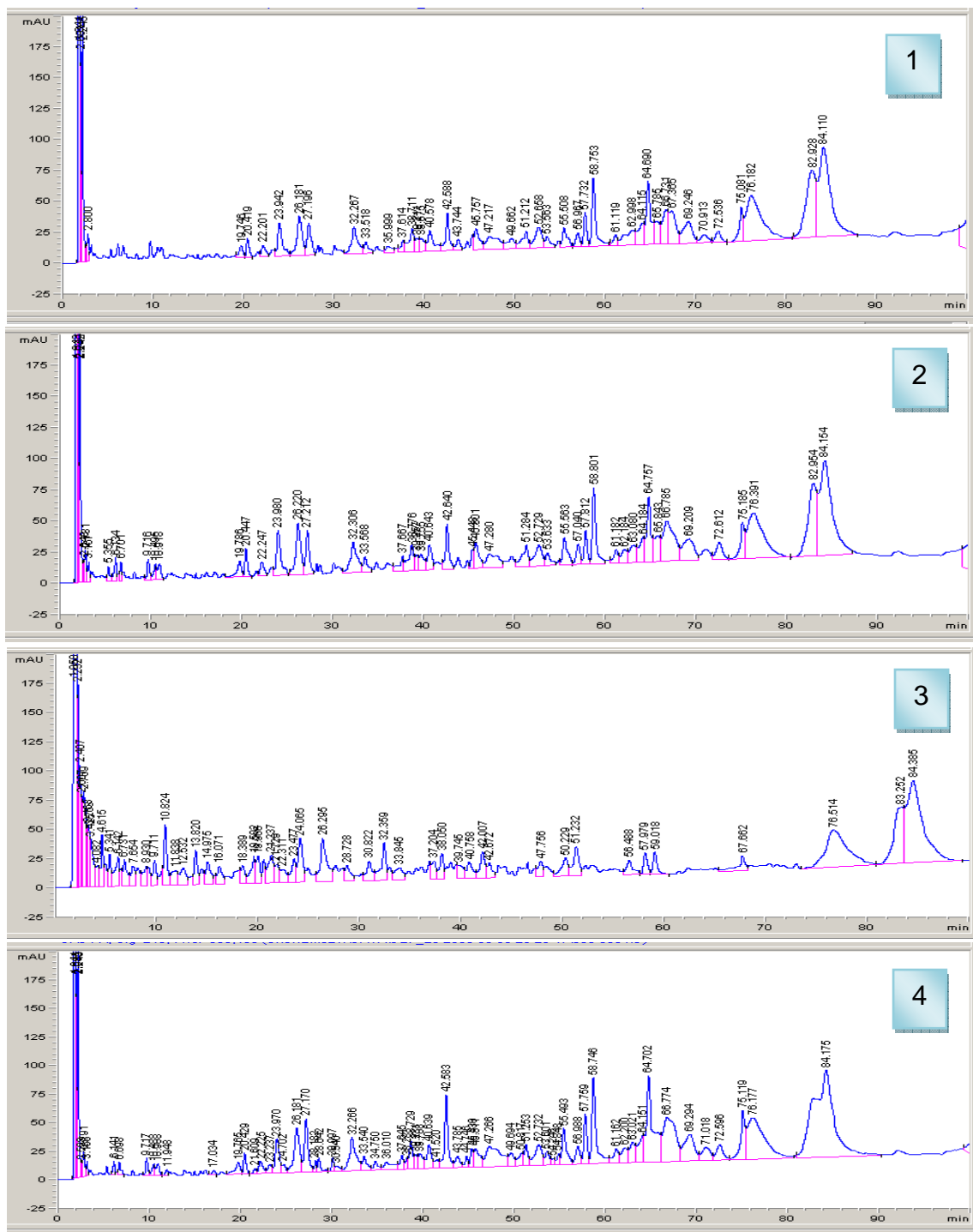


Figura 4. Perfil cromatográfico de los péptidos de los extractos de queso solubles a 14 días de almacenamiento en refrigeración a 8°C.

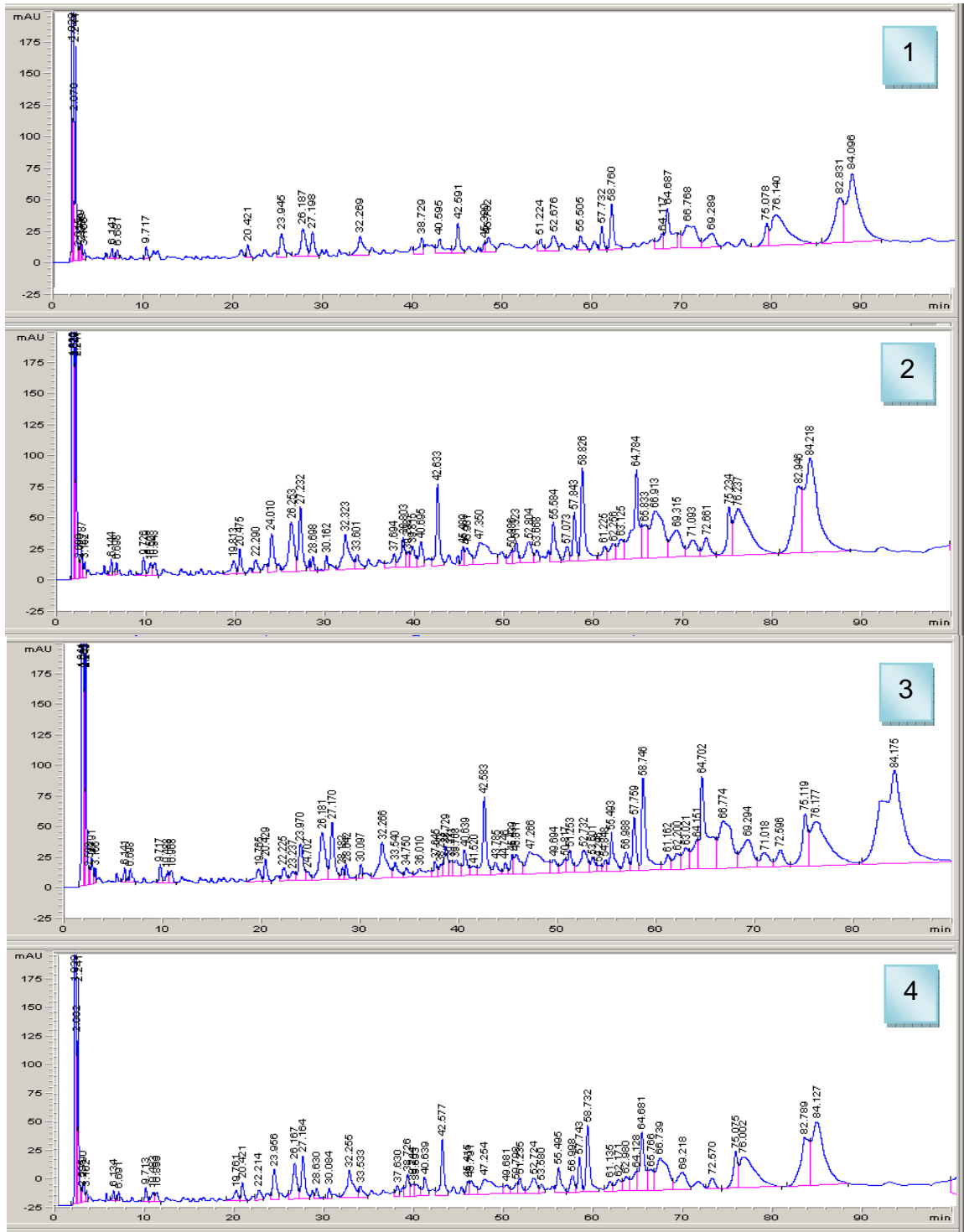


Figura 5. Perfil cromatográfico de los péptidos de los extractos de queso solubles en agua a 28 días de almacenamiento en refrigeración a 8°C.

VI.2 Estimación del tamaño molecular de los péptidos generados en el queso por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)

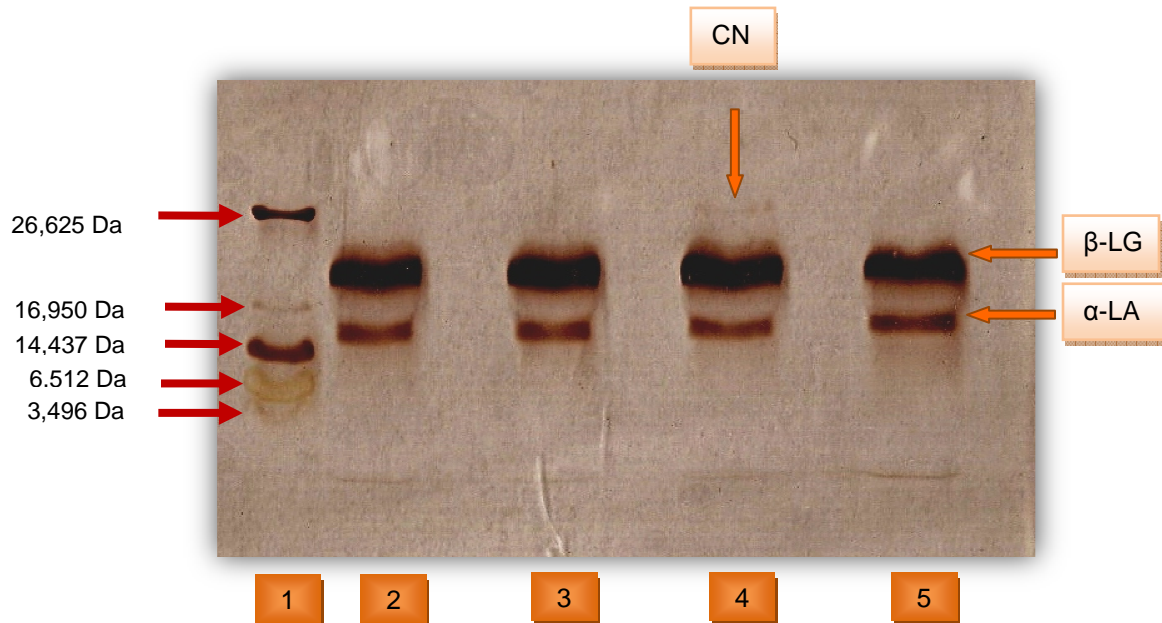


Figura 6. Separación de proteínas y péptidos en electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) del queso Cottage a 2 días de almacenamiento en refrigeración a 8°C. Da = Daltons, CN = Caseína, LG = Lactoglobulina, LA = Lactoalbúmina.

En la Figura 6 se observa el gel de electroforesis de los EQSA a 2 días almacenamiento en refrigeración a 8°C; en donde el Carril 1= estándar de pesos moleculares, Carril 2 = queso control, Carril 3 = queso con adición de una mezcla comercial de bacterias probióticas Yomix[®] 205, Carril 4 = queso con adición de *Lb. casei* y Carril 5 = queso con adición de *Lb. rhamnosus*.

Se observa la aparición de una pequeña banda con un peso molecular aproximado de 26,600 Da sólo en el queso con adición de *Lb. casei*.

En el queso control y en los quesos probióticos a 2 días de almacenamiento se observan bandas intensas semejantes correspondientes a las proteínas β -LG y α -LA de la leche.



Figura 7. Separación de proteínas y péptidos en electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) del queso Cottage a 14 y 28 días de almacenamiento en refrigeración a 8°C. Da = Daltons, CN = Caseína, LG = Lactoglobulina, LA = Lactoalbúmina.

En la Figura 7 se muestra el gel de electroforesis de los EQSA; donde Carril 1= estándar de pesos moleculares, Carril 2= queso control a 14 días de almacenamiento, Carril 3= queso control a 28 días de almacenamiento, Carril 4= queso con adición de una mezcla comercial de bacterias probióticas Yomix[®] 205 a 14 días de almacenamiento a 8°C, Carril 5 = queso con adición de una mezcla comercial de bacterias probióticas Yomix[®] 205 a 28 días de almacenamiento Carril 6 = queso con adición de *Lb. casei* a 14 días de almacenamiento, Carril 7= queso con adición de *Lb. casei* a 28 días de almacenamiento, Carril 8= queso con adición de *Lb. rhamnosus* a 14 días de almacenamiento, Carril 9= queso con adición de *Lb. rhamnosus* a 28 días de almacenamiento.

Se observa la aparición de las bandas correspondientes a las proteínas β-LG y α-LA contenidas en la leche pero con menor intensidad que las mostradas en el gel de electroforesis a los 2 días de almacenamiento; el queso con adición de *Lb. casei*

presentó la menor intensidad en las bandas tanto en el día 14 como en el 28 de almacenamiento en refrigeración a 8°C.

VI.3 Evaluación de la inhibición de la ACE en el extracto de queso soluble en agua

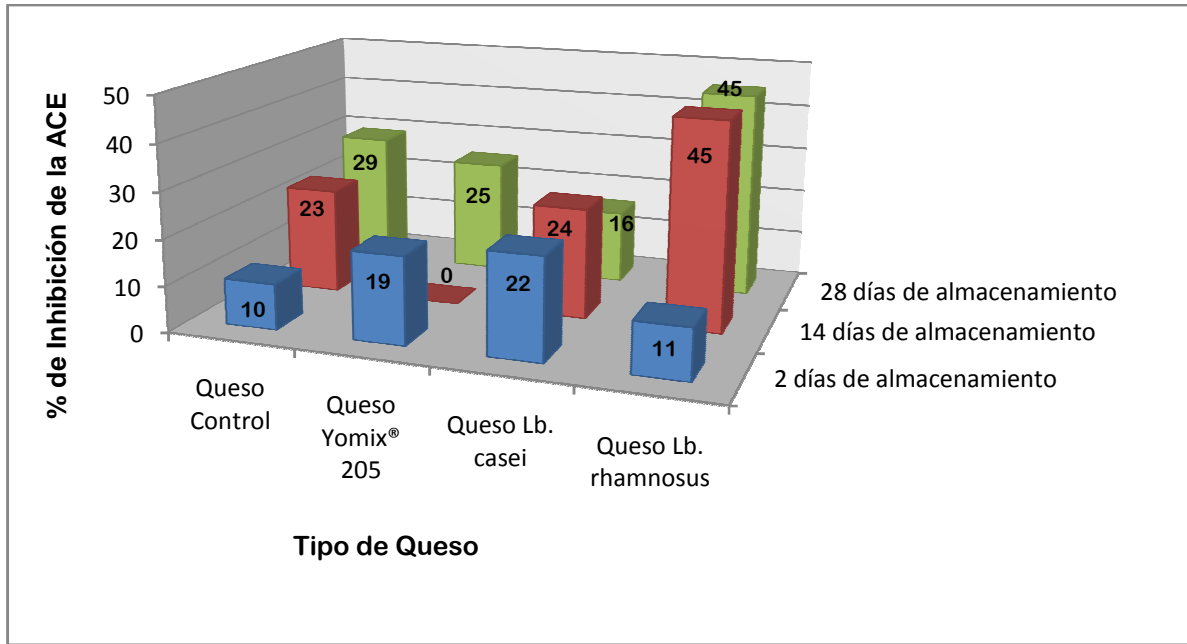


Figura 8. Porcentaje de inhibición de la ACE de los extractos de queso solubles en agua correspondientes al queso control y a los quesos probióticos a 2, 14 y 28 días de almacenamiento en refrigeración a 8°C.

En la Figura 8 se observa que en el queso control el porcentaje de inhibición aumentó conforme el tiempo de almacenamiento del queso, mientras que en el queso adicionado de la mezcla de bacterias probióticas Yomix® 205 la actividad de inhibición de la ACE fue nula a los 14 días de almacenamiento.

El queso con adición de *Lb. casei* presentó un porcentaje de inhibición muy similar en el día 2 y 14 de almacenamiento, sin embargo a los 28 días disminuyó considerablemente. El mayor porcentaje de inhibición de la ACE se presentó en el queso con adición de *Lb. rhamnosus* con un valor del 45 % que se mantuvo constante durante 14 días de almacenamiento.

VII. DISCUSIÓN

VII.1 Identificación de péptidos bioactivos en queso Cottage mediante HPLC en fase reversa

En las Figuras 4 y 5 se observa, el efecto de la adición de bacterias probióticas al queso Cottage el cual se traduce en un incremento significativo en el número de picos, comparado con el queso control (1), lo que indica que la adición de bacterias ácido lácticas a un queso favorece la proteólisis, la cual puede ser catalizada por enzimas de diversas fuentes incluyendo: enzimas nativas de la leche, el coagulante, el cultivo iniciador, la flora láctica asociada y los probióticos.

Se encontró diferencia en el número de picos entre los quesos adicionados con probióticos, en donde el queso adicionado con *Lb. casei* (3) presentó un número mayor de picos comparado con el queso adicionado con *Lb. rhamnosus* (4) y el queso con adición de la mezcla comercial de bacterias probióticas Yomix[®] 205 (2), sugiriendo que esta cepa mostró mayor capacidad proteolítica y por lo tanto liberó mayor número de fracciones peptídicas a partir de las proteínas precursoras de la leche.

Esta capacidad proteolítica está ampliamente distribuida en las bacterias ácido lácticas, principalmente en el género *Lactobacillus* en donde las peptidasas intracelulares pueden degradar las proteínas generando péptidos con potencial bioactivo. Las peptidasas de algunos microorganismos del género *Lactobacillus* como *L. helveticus*, han sido reportadas como una de las cepas de mayor capacidad proteolítica y se han caracterizado bioquímica y genéticamente, incluidas las aminopeptidasas, dipeptidasas, endopeptidasas y tripeptidasas (Christensen y col., 1999).

El queso control presentó un número menor de picos, aún cuando durante el proceso de manufactura del queso se llevó a cabo una proteólisis primaria por el cultivo iniciador que es altamente proteolítico. Se puede asumir que la combinación del cultivo iniciador y las bacterias probióticas generan mayor cantidad de péptidos.

La producción de péptidos de mediano y pequeño tamaño se generan por la acción de las proteinasas y peptidasas microbianas (Upadhyay y col., 2004)

La generación de péptidos podría estar relacionada con la modulación de la especificidad de las enzimas del queso por las condiciones fisicoquímicas (pH, actividad de agua, contenido de minerales y sales, entre otras), con la accesibilidad de los sustratos, debido al rearrreglo estructural durante la formación de la matriz caseica y con las condiciones ambientales en el queso (Gaganaire y col., 2001).

VII.2 Estimación del tamaño molecular de los péptidos generados en el queso por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)

En la Figura 6 se puede observar que a 2 días de almacenamiento en refrigeración a 8°C sólo en el queso con adición de *Lb. casei* (Carril 4) existió la aparición de una banda con un peso molecular aproximado de 26,600 Da correspondiente a las caseínas de la leche, lo que sugiere que la combinación del cultivo iniciador y la bacteria probiótica llevan a cabo una proteólisis más lenta de las proteínas de la leche en comparación con el resto de los quesos.

En el queso control y en los quesos probióticos a 2 días de almacenamiento se observan bandas intensas semejantes correspondientes a las proteínas β -LG y α -LA, lo que indica que la proteólisis generada por el cultivo iniciador en el caso del queso control y la combinación de este con las bacterias probióticas adicionadas no fue suficiente para degradar este tipo de proteínas.

Es necesario considerar que existen diversos factores que influyen en la hidrólisis de las caseínas y otras proteínas de la leche, dentro de las cuales se incluyen: la sal, el porcentaje de humedad, la calidad de la leche, la temperatura de almacenamiento, viabilidad de la bacterias, residuos del coagulante en el queso, proceso de manufactura, entre otros (Fox y col., 1993).

En la figura 7 se observa que en el transcurso del almacenamiento la concentración de las caseínas y otras proteínas provenientes de la leche disminuyó y los productos de la degradación aumentaron, en el caso del queso con adición de *Lb.*

casei (Carril 6 y 7) se observa que las bandas correspondientes a β -LG y α -LA disminuyen en intensidad a los 14 y 28 días de almacenamiento en comparación con las bandas observadas a 2 días de almacenamiento, esto indica que pudo ocurrir la degradación de las proteínas y la generación de péptidos de tamaño menor a 3,000 Da los cuales no se detectaron en esta técnica. Esto se puede apoyar en varios estudios que han mostrado que *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* y *Lb. paracasei* son microorganismos con una alta capacidad proteolítica capaz de liberar péptidos de tamaño pequeño y aminoácidos libres (Hickey y col., 1983; Gomes y col., 1995; Shihata y Shah, 2000).

VII.III Evaluación de la inhibición de la ACE en el extracto de queso soluble en agua

En la Figura 8 se presenta la actividad inhibitoria de la ACE en la que se observa que en el queso control aumentó el porcentaje de inhibición conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento.

Este queso generó una pequeña cantidad de péptidos de la proteólisis llevada a cabo por el cultivo iniciador, los cuales presentaron sitios de unión con la ACE, lo que provocó un aumento de la actividad inhibitoria de la enzima. Se ha reportado que la unión de los péptidos a la ACE está influida por la secuencia tripeptídica C-terminal de los mismos, que puede interaccionar con tres regiones del centro activo de la ACE (Ondetti y Cushman, 1982). Así, los aminoácidos de carácter hidrofóbico, como Trp, Tyr, Phe o Pro favorecen la unión a estas zonas.

El péptido con secuencia C-terminal Phe- Ala-Pro, análogo al encontrado en el inhibidor presente en el extracto del veneno de serpiente es uno de los más favorables para unirse al centro catalítico. La carga positiva del grupo guanidino o del grupo ϵ -amino de la Arg o Lys, respectivamente, contribuyen a la potencia inhibitoria (Cheung y col., 1980). El extremo N-terminal también influye en la actividad, y así, la presencia de Val o de Ile en esta posición incrementa la actividad inhibitoria de la ACE en el péptido.

El queso con adición de una mezcla comercial de bacterias probióticas Yomix® 205 presentó un porcentaje de inhibición variable durante el tiempo de almacenamiento, lo que sugiere que la secuencia peptídica de los péptidos generados cambió y por lo tanto la potencia inhibitoria se vio modificada.

El queso con adición de *Lb. casei* que presentó una mayor número de picos en HPLC en fase reversa y que fue confirmado en electroforesis con una mayor degradación de las proteínas, mostró una inhibición de la ACE mayor al día 2 de almacenamiento en comparación con el resto de los quesos probióticos y el queso control, posteriormente al día 14 el porcentaje de inhibición aumentó en 2 unidades, sin embargo al día 28 este porcentaje disminuyó considerablemente, lo que pudiera indicar que los péptidos generados al día 28 de almacenamiento presentaron una secuencia peptídica diferente a los producidos al día 14, lo que se observó en una disminución de la actividad inhibitoria de la ACE.

Ha sido reportado que la presencia de aminoácidos dicarboxílicos en la secuencia peptídica o de Pro como penúltimo aminoácido disminuye o anula la actividad inhibitoria de la ACE (Erdös, 1976; Cushman y col., 1977).

El queso con adición de *Lb. rhamnosus* presentó un porcentaje de inhibición de la ACE relativamente bajo al inicio de su fabricación, sin embargo se observó un aumento significativo al día 14 de almacenamiento en la actividad inhibitoria de la ACE observándose constante en el día 28; esto sugiere que no se generaron péptidos en el transcurso de los 14 días o bien, que los péptidos producidos presentaron también una secuencia peptídica activa al sitio de unión con la ACE y por lo tanto la actividad inhibitoria fue similar.

VIII. CONCLUSIONES

El número de péptidos liberados en los quesos con adición de bacterias probióticas fue diferente respecto al queso control, lo cual probablemente se debió a la liberación de enzimas proteolíticas generadas por las bacterias probióticas adicionadas.

Lb. casei resultó ser una bacteria probiótica con una alta capacidad proteolítica y por lo tanto generó mayor número de péptidos en el queso al cual fue adicionado.

La mayor actividad inhibitoria de la ACE se obtuvo de los péptidos generados en el queso probiótico con adición de *Lb. rhamnosus* alcanzando un 45% de inhibición constante durante 14 días de almacenamiento, sin embargo este valor es relativamente bajo al compararse con quesos madurados en donde se reporta un rango de entre 80 y 90% de inhibición. Lo que sugiere que el potencial inhibitorio de la ACE no depende de la cantidad de péptidos generados sino de la secuencia peptídica que estos presenten.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. e Itoh, T. 1998. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *Journal of Dairy Science*. Vol.81:3131-3138.

Addeo, F., Chianese, L., Salzano, A., Sacchi, R., Cappuccio, U., Ferrenti, P., Malorni, A. 1992. Characterization of the 12% trichloroacetic acid-insoluble oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese. *Journal of Dairy Research*. Vol.59:401-411.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. 2002. *Short Protocols in Molecular Biology*. Fifth Edition. Wiley, USA:10 Chapter.

Bakhle, YS. 1968. Conversion of angiotensin I to angiotensin II by cell-free extracts of dog lung. *Nature*. Vol.220:919-921.

Belem, MAF., Gibbs, B., Lee, HB. 1999. Proposing sequences for peptides derived from whey fermentation with potential bioactive sites. *Journal of Dairy Science*. Vol.82:486-493.

Betoret, N., Puente, L., Díaz, M.J., Pagan, M.J., García, M.J., Gras, M.L., Martínez-Monzó, J., Fito, P. 2003. Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering*. Vol.56: 273-277.

Blanchette, L., Roy, D., Belanger, G. and Gauthier, S.F. 1996. Production of Cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. *Journal Dairy Science*. Vol.79:8-15.

Boylston, T.D., Vinderola, C.G., Ghoddusi, H.B., and Reinheimer, J.A. 2004. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: Challenges and rewards. *International Dairy Journal*. Vol.14:375-387.

Cheung, HS., Wang, F L., Ondetti, M.A., Sabo, E.F., Cushman, DW. 1980. Binding of peptides substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. Vol.25:401-407.

Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S.S., Webb, C. 2002. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of*

Food Microbiology. Vol.79:131-141.

Christensen, JE., Dudley, EG., Pedersen, JA., Steele, JL. **1999.** Peptidases and aminoacid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol.76: 217-246.

Creamer, L. K. y MacGibbon, A. K. H. 1996. Some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids. *International Dairy Journal*. Vol.6:539-568.

Crofcheck, CL., Payne, FA., Nokes, SE. **1999.** Predicting the cutting time of cottage cheese using light backscatter measurements. *Transactions of the ASAE*. Vol.42:1039–1045.

Cushman, DW., Cheung, HS., Sabo, EF., Ondetti, MA. **1977.** Design of potentcompetitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry*. Vol.16:5484-5491.

Cushman, DW., Cheung, HS. **1971.** Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemistry Pharmacology*. Vol.20:1637-1648.

Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern E.B., Roberfroid, M. **1999.** Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus Document. *British Journal Nutrition*. Vol.81:S1S27.

Emmons, DB., Beckett, DC. **1984.** Effect of pH at cutting and during cooking on cottage cheese. *Journal of Dairy Science*. Vol.67:2200–2209.

Erdös, E. 1975. Angiotensin I-converting enzyme. *Circulation Research*. Vol.36:247-255.

Erdös, E. 1976. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *American Journal of Medicine* Vol.60:749-759.

Fazel, A. 1998. Nutritional and health benefits of yogurt and fermented milks. Functional peptides. *Danone World Newsletter*.

Ferreira, SH. 1965. *British Journal of Pharmacology*. Vol.24:163.

Ferreira, SH., Bartet, DC., Greene, LJ. **1970.** Isolation of Bradykinin-potentiating peptides from Bothrops jararaca venom. *Biochemistry*. Vol.9:2583-2593.

FitzGerald, RJ., Meisel, H. **2003.** Caseinophosphopeptides (CPPs) as functional ingredients. *Funtional Dairy Products*. Mattila-Sandholm T, Saarela M, editors.

Cambridge:188-202.

Fox, P.F. Law, L. McSweeney, P.L.H., and Wallace, J. **1993**. Biochemistry of cheese ripening. In Fox, P.F. (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (2nd ed). London, UK: Chapman and Hall. 343-367.

Fujita, H., Yokoyama, K., Yoshikawa, M. **2000**. Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *Journal of Food Science*. Vol.65:564-569.

Gagnaire, V., Mollé, D., Herrouin, M., Léonil, J. **2001**. Peptides identified during Emmental cheese ripening: origin and proteolytic systems involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol.49:4402-4413.

Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F. y 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 Environmental Microbiology*. Vol.66:3898-3904.

Gomes, A.M.P. Malcata, F.X. and Klaver, F.A.M. **1995**. Incorporation and survival of *Bifidobacterium* sp. strain Bo and *Lactobacillus acidophilus* strain Ki in a cheese product. *Netherlands Milk and Dairy Journal*. Vol.49:71-95.

Gómez-Ruiz, JA., Ramos, M., Recio, I. **2002**. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *International Dairy Journal*. Vol.12:697-706.

Hamel, U., Kielwein, G., Teschemacher, H. **1985**. β -casomorphin immunoreactive materials in cow's milk incubated with various bacterial species. *Journal of Dairy Research*. Vol.52:139-148.

Harwalkar, V. R. y McMahon, D. J. **1993**. Symposium: biological and food functional characteristics of milk protein hydrolysis products. *Journal Dairy Science*. Vol.76:300.

Hernández, L.B. **2002**. Caracterización y Bioactividad de Péptidos obtenidos a partir de Proteínas Lácteas mediante Hidrolisis Enzimática y Procesos Fermentativos. Universidad Complutense de Madrid. Tesis para obtener el título de Doctorado en Farmacia. 47.

Hickey, M., Hillier, A., and Jago, G. **1983**. Peptidases activities in lactobacilli.

Australian Journal . Dairy Technology. Vol.38:118.

Ishibashi, N. & Shimamura, S. 1993. Bifidobacteria: research and development in Japan. Food. Technology. June:126-135.

Kim, SK., Byun, HG., Park, PJ., Shahidi, F. 2001. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. Journal Agricultural and Food Chemistry. Vol.49:2992-2997.

Kohama, Y., Matsumoto, S., Oka, H., Terramoto, T., Okabe, M., Mimura, T. 1988. Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from tuna muscle. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol.155:332-337.

Kohama, Y., Oka, H., Kayamori, Y., Tsujikawa, K., Mimura, T., Nagase, Y., Satake, M. 1991. Potent synthetic analogues of angiotensin-converting enzyme inhibitor derived from tuna muscle. Agricultural Biology and Chemistry. Vol.55:2169-2170.

Kohmura, M., Nio, N., Kubo, K., Minoshima, Y., Munekata, E., Ariyoshi, Y. 1989. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptides of human β -casein. Agricultural Biology and Chemistry. Vol.53:2107-2114.

Korhonen, H., Pihlanto-Leppälä, A., Rantamäki, P. y Tupasela, T. 1998. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends Food Science Technology*. Vol.9: 307-319.

Korhonen, H., Pihlanto-Leppälä, A. 2003. Food-derived Bioactive Peptides – Opportunities for designing Future Foods. Current Pharmaceutical Design. Vol.9:1297-1308.

Korhonen, H., Pihlanto-Leppälä, A. 2003. Bioactive peptides: new challenges and opportunities for the dairy industry. Australian Journal Dairy Technology. Vol.5:129-134.

Korhonen, H., Pihlanto-Leppälä, A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. International Dairy Journal. Vol.16:945-960.

Kosikowski, FV. 1982. Cheese and Fermented Milk Foods. Edward Brothers, Inc.

Kuchroo, C.N. and Fox, P.F. 1982. Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft*. Vol.37:331–335.

Kunji, ER., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., Konings, WN. 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. Vol.70:187–221.

Laffan, R.J., Goldberg, M.E., High, J.P., Schaffer, T.R., Waugh, M.H., Rubin, B. 1978. Antihypertensive activity in rats of SQ 14,225, an orally active inhibitor of angiotensin I converting enzyme. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Vol.204:281-288.

Laffineur, E., Genetet, N., Leonil, J. 1996. Immunomodulatory activity of beta-casein permeate medium fermented by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. Vol.79:2112-2120.

Laemmli, U.R. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*. Vol.227:680-685.

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

Lee, Y.J. y Salminen, S. 1995. The coming age of probiotic. *Trends in Food Science and Technology*. Vol:t6:241-245.

Maeno, M., Yamamoto, N., Takano, T. 1996. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal Dairy Science*. Vol.79:1316-1321.

Marshall, V. W. y Tamime, A. Y. 1997. Starter cultures employed in the manufacture of biofermented milks. *International Journal of Dairy Technology*. Vol.50:35-41.

Maruyama, S., Suzuki, H. 1982. A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agricultural Biology and Chemistry*. Vol.46:1393-1394.

Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Kurono, M., Tomizuka, N. y Suzuki, H. 1987a. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of α s1-casein. *Agricultural Biology and Chemistry*. Vol.51:2557-2561.

Maruyama, S., Miyoshi, S., Kaneko, T., Tanaka, H. 1989a. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of synthetic peptides related to the tandem repeated sequence of a maize endosperm protein. *Agricultural Biology and Chemistry*. Vol.53:1077-1081.

Matar, C., Amiot, 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. Vol.79:971-979.

Matar, C., Nadathur, S. S., Bakalinski, A. T. y Goulet, J. 1997. Antimutagenic effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* L89 and a protease-deficient derivative. *Journal Dairy Science*. Vol.80:1965-1970.

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

Matsumura, N., Fujii, M., Takeda, Y., Sugita, K., Shimizu, T. 1993. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. Vol.57:1743-1744.

Mattila-Sandholm, T. and M. Saarela. 2003. *Functional Dairy Products*. Woodhead Publishing Limited Abington Cambridge England. CRC. Press LLC. Boca Raton. 395.

Meisel, H., Goepfert, A., Gunther, S. 1997. ACE inhibitory activities in milk products. *Milchwissenschaft*. Vol.52:307-311.

Meisel, H. 1998. Overview on milk proteins-derived peptides. *International Dairy Journal*. Vol.8:363-373.

Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H., Maruyama, S. 1991. Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an alpha-zein hydrolysate. *Agricultural Biology and Chemistry*. Vol.55:1313-1318.

Mullally, MM., Meisel, H., FitzGerald, RJ. 1997. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *Int Dairy J*. Vol.7:299-303.

Mullally, MM., Meisel, H., Fitzgerald, RJ. 1997a. Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Lett*. Vol.402:99-101.

Mullally, MM., Meisel, H., Fitzgerald, RJ. 1997b. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *International Dairy Journal*. Vol.7:299-303.

Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., Takano, T. 1995.

Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal Dairy Science*. Vol.78:777-783.

Ng-Kwai-Hang, KF., Vane, JR. **1970**. Some properties of angiotensin converting enzyme in the lung in vivo. *Nature*. Vol.225:1142-1144.

Okamoto, A., Hanagata, H., Matsumoto, E., Kawamura, Y., Koizumi, Y., Yanagida, F. **1995**. Angiotensin I converting enzyme inhibitory activities of various fermented milks. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. Vol.59:1147-1149.

Ondetti, MA., Cushman, DW. **1982**. Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annual Review of Biochemistry*. Vol.51:283-308.

Ondetti, MA., Williams, NJ., Sabo, EF., Pluscec, J., Weaver, ER., Kocy, O. **1971**. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure and synthesis. *Biochemistry*. Vol.10:4033-4039.

Osajima, K., Nakashima, M., Osajima, Y. **1994**. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolysate derived from sardine muscle. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. Vol.58:2244-2245.

Ouwehand, A.C., Salvadori, B.B., Fonden, R., Morgensen, G., Salminen, S., and Sellars, R. **2003**. Health Effects of Probiotics and Culture-Containing Dairy Products in Humans. *International Dairy Bull.* 380.

Payne, FA., Hicks, CL., Shen, PS. **1993**. Predicting optimal cutting time of coagulating milk using diffuse reflectance. *Journal of Dairy Science*. Vol.76:48–61.

Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T., Korhonen, H. **1998**. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International Dairy Journal*. Vol.8:325-33.

Pihlanto-Leppälä, A. 2000. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends Food Science Technology*. Vol.1:347-356.

Pihlanto-Leppälä, A. **2001**. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends Food Science Technology*. Vol.11:347-356.

Poolman, B., Kunji, E., Hagting, A., Juillard, V., and Konings, W. **1995**. The proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Bacteriology*

Symposium Supplement. Vol.79:65S-75S.

Roudot-Algaron, F., LeBars, D., Kerhoa, L., Einhorn, J., Gripon J.C. 1994. Phosphopeptides from comté cheese: nature and origin. *Journal Food Science*. Vol.59: 544-547.

Ryhänen, EL., Pihlanto-Leppälä, A., Pahkala, E. 2001. A new type of ripened low fat cheese with bioactive properties. *International Dairy Journal*. Vol.11:441-447.

Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh, T. 2000. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in gouda cheese. *Journal of Dairy Science*. Vol. 83:1434-1440.

Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand. 2004. *Lactic Acid Bacteria, 3rd Edition, Revised & Expanded*. Marcel Dekker. 656.

Sanders, G. 1993. Long-term Temporal Trends of PCBs and PAHs in the Environment and their Fate and Behaviour in Lacustrine Systems. Ph.D. Thesis, University of Lancaster.

Schanbacher, FL., Talhouk, RS., Murray, FA., Gherman, LI., Willett, LB. 1998. Milk-borne bioactive peptides. *International Dairy Journal*. Vol.8:393-403.

Singh, TJ., Fox, PF., Healy, A. 1997. Isolation and identification of further peptides in the diafiltration retentate of the water-soluble fraction of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*. Vol.64:433-443.

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

Skeggs, LT., Kahan, JE., Sumway, NP. 1956. The preparation and function of the angiotensin-converting enzyme. *Journal of Experimental Medicine*. Vol.103, 295-299.

Smacchi, E. y Gobbetti, M. 2000. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology*. Vol.17:129-14.

Soffer, RL. 1976. Angiotensin-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. *Annual Review of Biochemistry*. Vol.45:73-94.

Smacchi, E., Gobbetti, M., 1998. Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*.

Vol.22:687-694.

St-Gelais, D., Champagne, CP., Erepmoc, F., Audet, P. **1995**. The use of electrical conductivity to follow acidification of dairy blends. *International Dairy Journal* Vol.5:427–438.

Storry, J. E., Grandison, A. S., Millard, D., Owen, A. J. y Ford, G. D. **1983**. Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminants. *Journal Dairy Research*. Vol.50:215.

Thomas, T. D. y Pritchard, G. G. **1987**. Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol.46:245-268.

Tirelli, A., De Noni, I., Resmini, P. **1997**. Bioactive peptides in milk products. *Italian Journal of Food Science*. Vol.2:91-98.

Tomé, D., Dehabbi H. **1998**. Physiological effects of milk protein components. *International Dairy Journal*. Vol.8:383-392.

Tuhoy, M.K., Probert, H.M., Smejkal, C.W., Gibson, G.R. **2003**. Using probiotics and prebiotic to improve gut health. *Drug discovery today*. Vol.8:692-700.

Unger, T., Rockhold, RW., Bönner, G., Rascher, W., Schaz, K., Speck, G., Schömig, A. Ganten, D. **1981**. Antihypertensive effects of the novel converting-enzyme inhibitor YS980 in spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Hypertension*. Vol.3:121-140.

Upadhyay, V.K. McSweeney, P.L.H. Magboul, A.A.A., and Fox, P.F. **2004**. Proteolysis in Cheese during Ripening. In Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Timothy, M.C., and Timothy, P.G. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (3rd ed), Vol. 1. London, UK: Elsevier Academic Press. 390-433.

Van Hekken, D. and Farkye, N.Y. **2003**. Hispanic cheeses: the quest for queso. *Food Technology*. Vol.57:32-38.

Walstra, P. y Jennes, R. **1987**. *Química y Física Lactológica*. Ed. Acribia. Zaragoza.

Walstra, P., Geurts, TJ., Noomen, A., Jellema, A., Van Boekel, MAJS. **2001**. *Ciencia de la Leche y Tecnología de los Productos Lácteos*. Zaragoza: Acribia S.A.

Walstra, P., Wouters, JTM., Geurts, TJ. **2006**. *Dairy Science and Technology*, 2nd ed. CRC Press. Boca Raton FL:699.

Whitney, R. M. **1988**. Proteins of milk. En *Fundamentals of dairy chemistry*. Titird

edition, Van Nostrand Reinhold Company Inc., New York:81-169.

Williams, AG., Noble, J., Tammam, J., Lloyd, D., Banks, JM. **2002**. Factors affecting the activity of enzymes involved in peptide and amino acid catabolism in non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal*. Vol.12:841–852.

Wyvratt, MJ., Patchett, AA. **1985**. Recent developments in the design of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Medicinal Research Reviews*. Vol.5:485-531.

Yamamoto, N. **1997**. Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Biopolymers*, Vol.43:119-128.

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*. Vol.82:1388-1393.

Yano, S., Suzuki, K., Funatsu, G. **1996**. Isolation from α -zein of thermolysin peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. Vol.60:661-663.