



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**  
**LICENCIATURA EN NUTRICIÓN**

**EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**  
**EN LECHE FERMENTADAS POR *Lactococcus lactis***

**TESIS**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL  
GRADO DE

**LICENCIADO EN NUTRICIÓN**

PRESENTA

**LILIA MARÍA BELTRÁN BARRIENTOS**

DIRIGIDA POR

**DRA. BELINDA VALLEJO GALLAND**

CENTRO UNIVERSITARIO  
QUERÉTARO, QRO. MÉXICO  
Junio, 2010



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**  
**LICENCIATURA EN NUTRICIÓN**

**EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE  
EN LECHE FERMENTADAS POR *Lactococcus lactis***

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en Nutrición

**Presenta:**

Lilia María Beltrán Barrientos

**Dirigido por:**

Dra. Belinda Vallejo Galland

Dra. Belinda Vallejo Galland  
Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Teresa García Gasca  
Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

cDr. Aarón F. González Córdova  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Olga P. García Obregón  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

Santiago de Querétaro, México  
Junio, 2010

## DECLATORIA

El presente trabajo de tesis se realizo bajo la dirección de la Dra. Belinda Vallejo Galland en colaboración con el cDr. Aarón González Córdova y Dr. Roberto Rodríguez Ramírez en el laboratorio de **Calidad, Autenticidad y Trazabilidad de los Alimentos y Química y Biotecnología de Productos Lácteos**, de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal, del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

## INDICE

<b>INDICE</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE FIGURAS</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE TABLAS</b>	<b>V</b>
<b>INDICE GRÁFICAS</b>	<b>VI</b>
<b>DEDICATORIA</b>	<b>VII</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>VIII</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>IX</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>X</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>4</b>
Alimentos funcionales	4
La leche	7
Proteínas lácteas	9
Péptidos bioactivos	12
Hidrólisis Enzimática	14
Procesamiento de alimentos	17
Fermentación microbiana	17
Péptidos opioides	19
Péptidos antihipertensivos	20
Fosfopéptido caseína	21
Péptidos antitrombóticos	22

Péptidos inmunomoduladores	22
Lactoferrina	23
Inmunoglobulinas	23
Péptidos Antioxidantes	24
Reacciones de oxidación	27
Antioxidantes	29
Evaluación de la actividad antioxidante	29
Método del ABTS	32
<b>III. HIPOTESIS</b>	<b>35</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
Objetivo General	35
Objetivos Específicos	35
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>36</b>
Cepas de <i>Lactococcus lactis</i>	36
Reactivos	36
Elaboración de leches fermentadas	36
Obtención de extractos peptídicos solubles en agua a partir de leches fermentadas	38
Preparación de las Muestras	38
Curva estándar de antioxidantes	39
Detección de la capacidad antioxidante mediante el método del ABTS	39
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>43</b>
Actividad antioxidante expresada como equivalente de Trolox (TEAC)	45
Capacidad antioxidante en leches fermentadas por bacterias ácido lácticas	45
Porcentaje de inhibición	50

Porcentaje de actividad antioxidante	55
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	<b>58</b>
<b>VIII. LITERATURA CITADA</b>	<b>59</b>

## ÍNDICE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Posibilidades para obtener un alimento funcional	5
<b>Figura 2.</b> Funciones fisiológicas de los péptidos bioactivos derivados de leches	15
<b>Figura 3.</b> Barreras potenciales de activación o inactivación de las proteínas durante la digestión y absorción gastrointestinal	16
<b>Figura 4.</b> Ensayo del ABTS	41

## ÍNDICE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Concentración de las proteínas de leche	10
<b>Tabla 2.</b> Efecto funcional de las proteínas y péptidos del lactosuero	11
<b>Tabla 3.</b> Péptidos bioactivos de leche y sus efectos beneficiosos en la salud	13
<b>Tabla 4.</b> Mecanismo de la oxidación de lípidos	28
<b>Tabla 5.</b> Mecanismo de acción de los antioxidantes	30
<b>Tabla 6.</b> Generación del radical ABTS <sup>•+</sup> por medio de mioglobina y peróxido de hidrógeno	33
<b>Tabla 7.</b> Fuentes de cepas <i>Lactococcus lactis</i> a partir de diferentes nichos ecológicos	37
<b>Tabla 8.</b> Capacidad de la actividad antioxidante de <i>L. lactis</i> aisladas de diferentes fuentes	44
<b>Tabla 9.</b> Concentraciones de Trolox	46
<b>Tabla 10.</b> Capacidad antioxidante de las cepas expresada en equivalentes de Trolox (TEAC)	49
<b>Tabla 11.</b> Porcentaje de actividad en los extractos acuosos	56

## INDICE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Curva estándar de Trolox	47
<b>Gráfica 2.</b> Porcentaje de inhibición de los EA	51
<b>Gráfica 3.</b> Porcentaje de inhibición del grupo 1 de los EA	52
<b>Gráfica 4.</b> Porcentaje de inhibición del grupo 2 de los EA	53
<b>Gráfica 5.</b> Porcentaje de inhibición del grupo 3 en EA	54

## **DEDICATORIA**

Hasta concluir mi tesis.

## **AGRADECIMIENTOS**

Estos serán escritos hasta concluir mi tesis.

## RESUMEN

Las reacciones de oxidación producen radicales libres, que son responsables del inicio de reacciones en cadena, que dañan a las células y provocan el estrés oxidativo. Numerosos estudios relacionan a las especies reactivas de oxígeno con enfermedades como el envejecimiento, las cardiovasculares, las del sistema nervioso, el daño genético causante de mutaciones o cánceres, entre otros. Estudios recientes han demostrado que algunos alimentos, además de las frutas, presentan actividad antioxidante; tal es el caso de la leche y los productos lácteos. Sin embargo, recientemente se ha reportado que ciertos péptidos generados como producto de la fermentación de la leche, presentan diferentes actividades biológicas, entre ellas la antioxidante. Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue, evaluar la actividad potencialmente antioxidante de péptidos provenientes de extractos acuosos de leches fermentadas por cepas de *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) aisladas de diferentes nichos ecológicos. Para lograr dicho objetivo se utilizaron 20 cepas de *L. lactis* previamente aisladas de fuentes vegetales, lácteos artesanales y cultivos lácticos comerciales como cultivo iniciador para la fermentación de leche. Se evaluaron dos concentraciones (1 mg y 0.5 mg) de extractos acuosos liofilizados (EA) menores a 3 kDa en disolución tampón de PBS. La capacidad antioxidante se determinó por el método TEAC (actividad antioxidante expresada como equivalentes de Trolox), utilizando ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) como radical. Dentro de los EA evaluados, 18 mostraron actividad antioxidante con valores de TEAC entre 1.33-228  $\mu$ M de Trolox, siendo los extractos M1, E3 y R7 los que presentaron la mayor capacidad antioxidante, para ambas concentraciones ensayadas. En base a los valores de TEAC observados, los péptidos obtenidos en los EA por la fermentación de leche con *L. lactis* presentan capacidad potencialmente antioxidante.

Palabras clave: actividad antioxidante, leches fermentadas, péptidos, ABTS, TEAC.

## SUMMARY

Oxidation reaction produces free radicals which are responsible of chain reactions that produce oxidative stress. Numerous studies relate reactive species with diseases such as premature aging, cardiovascular, nervous and genetic damage which cause mutations and cancer, among others. Recent studies have demonstrated that some natural sources, besides fruit, may have antioxidant activity, such as milk and dairy. Recently it has been demonstrated that peptides generated as product of the fermented milk, are biologically active, such as antioxidant. For these reasons, the objective of this present study was to evaluate the potentially antioxidant capacity of peptides from aqueous extracts (AE) fermented milk by *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) of isolation different sources. 20 strains from vegetable, artisanal dairy and commercial sources were used as started culture for the fermentation of milk. Two different concentrations (1 mg and 0.5 mg) of the aqueous extracts lyophilized (AE) smaller than 3 kDa dissolved in PBS buffer were evaluated. The antioxidant capacity was measured by TEAC assay, using ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzotiazolin)-6-sulfonic acid) as radical. In the AE evaluated 18 showed to have antioxidant activity, M1, E3 and R7 presented the most antioxidant capacity in both concentrations. The corresponding values of TEAC of peptides in the AE from the fermentation of milk with *L. lactis* presented potentially antioxidant activity.

Key words: antioxidant activity, fermented milk, peptides, ABTS, TEAC.

## I. INTRODUCCIÓN

Según un informe elaborado por expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), denominado “Dieta, nutrición y prevención de las enfermedades crónicas”, uno de los principales problemas de salud pública de los países desarrollados está relacionado con el enorme crecimiento que están teniendo las enfermedades crónicas degenerativas, entre las cuales se encuentran la obesidad, diabetes tipo 2 (Mellitus), enfermedades cardiovasculares (ECV), tales como hipertensión, hipercolesterolemia, hipertriglicemia, algunos tipos de cáncer (colon, etc.), osteoporosis, etc. (OMS, 2003).

Según este informe, dichas enfermedades originaron en el año 2001 alrededor del 60% de las muertes en los países desarrollados y de estas casi la mitad fueron debidas a ECV (15,3 millones). Asimismo, la obesidad y el sobrepeso, junto con enfermedades crónicas degenerativas (cardiopatías, hipertensión, dislipemias y diabetes tipo 2) se consideran que han alcanzado carácter de epidemia a nivel mundial, ya que 1.000 millones de personas adultas tienen sobrepeso y de ellas, al menos 300 millones tienen obesidad (OMS, 2003).

Un estudio realizado en México por el Instituto Nacional de Salud Pública en el 2006, llamado ENSANUT, el 70% de la población mexicana tiene sobrepeso y/o obesidad; con respecto a la hipertensión arterial el 30.8% de la población lo padece, el 26.5% de la población tiene hipercolesterolemia, mientras que 6.8 millones de la población nacional fue diagnosticada con diabetes. El incremento porcentual del sobrepeso y obesidad debe considerarse riesgoso, ya que son factores de riesgo importantes en el desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas, tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer (ENSANUT, 2006).

En general, los requisitos nutricionales necesarios para una alimentación correcta y equilibrada, se consiguen a través de una dieta variada, sana, personalizada y saludable (Carbajal et al., 2005). Sin embargo, en algunos casos, ciertos colectivos de la sociedad o pacientes con enfermedades crónicas presentan carencias o desajustes alimentarios, que desencadenan en patologías y necesidades alimentarias específicas.

Según el concepto tradicional de nutrición, la principal función de la dieta había sido aportar los nutrimentos necesarios para el buen funcionamiento del organismo “nutrición adecuada”. Sin embargo, hoy en día este concepto se está sustituyendo por “nutrición óptima”, que contempla la posibilidad de que algunos alimentos mejoren nuestra salud y contribuyan a prevenir determinadas enfermedades.

Esta definición además conlleva una serie de recomendaciones dietéticas para reducir el consumo de determinados alimentos o sus componentes, así como el desarrollo de nuevos alimentos modificando su composición original, tanto en su contenido en nutrimentos como en no nutrimentos (Diplock et al., 1999).

A partir de tales planteamientos aparecen los llamados “alimentos funcionales”, cuyo desarrollo se basa en la relación entre dieta y salud, y en las posibilidades preventivas de la nutrición.

La investigación científica que se ha llevado a cabo en los últimos años, ha demostrado el papel que juegan ciertos componentes químico-nutricionales en la prevención y tratamiento de muchas enfermedades. Esta situación ha provocado un cambio del simple concepto de alimento como fuente de nutrimento, a uno más integral que traduce la potencialidad que los alimentos pueden tener, no solo de nutrir, sino también de prevenir y curar enfermedades. Este enfoque en el estudio de los alimentos se orienta hacia la exaltación de las propiedades benéficas de ciertos compuestos químicos, situación reconocida desde hace muchos años, y en el cual se basa la ciencia de la Nutrición.

La leche y los productos lácteos contienen diversos compuestos con actividad fisiológica. Donde algunos de estos compuestos bioactivos ya están siendo utilizados en algunos productos comerciales, como por ejemplo: la peroxidasa en pasta dental para evitar la caries, la lactoferrina en fórmulas lácteas infantiles como antibacterial y la lactulosa como producto bifidogénico. Sin embargo existen otros productos lácteos que presentan potencial y pueden ser empleados como alimentos funcionales, sin embargo no se están utilizando con esa finalidad.

Los derivados lácteos y la leche contienen proteínas y péptidos con efectos benéficos para la salud. Tales efectos son el disminuir el riesgo de desarrollo de ciertos padecimientos y enfermedades que afectan normalmente a los sistemas digestivo, cardiovascular, nervioso e inmunológico.

Diferentes evidencias sugieren que los antioxidantes ingeridos en la dieta contribuyen a prevenir el daño oxidativo en el organismo y reducir el riesgo de sufrir ciertas enfermedades, tales como las crónicas degenerativas, algunos tipos de cáncer, envejecimiento, etc. Por otro lado inhibir o limitar la oxidación de los lípidos en los alimentos, resulta fundamental en cuanto a que algunos compuestos que se originan están implicados en el inicio o el progreso de procesos de envejecimiento, cáncer, enfermedades cardiovasculares, entre otras. Se ha reportado que las proteínas a partir de leche y de leches fermentadas son fuentes de antioxidantes naturales, en forma de péptidos antioxidantes. Por ello resulta importante hoy en día su estudio, para que esta clase de alimentos sigan incorporándose en la dieta habitual con mayor auge.

Por lo anterior el objetivo de este trabajo consistió en evaluar la actividad antioxidante de péptidos a partir de leches fermentadas por *Lactococcus lactis* provenientes de diferentes nichos ecológicos.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

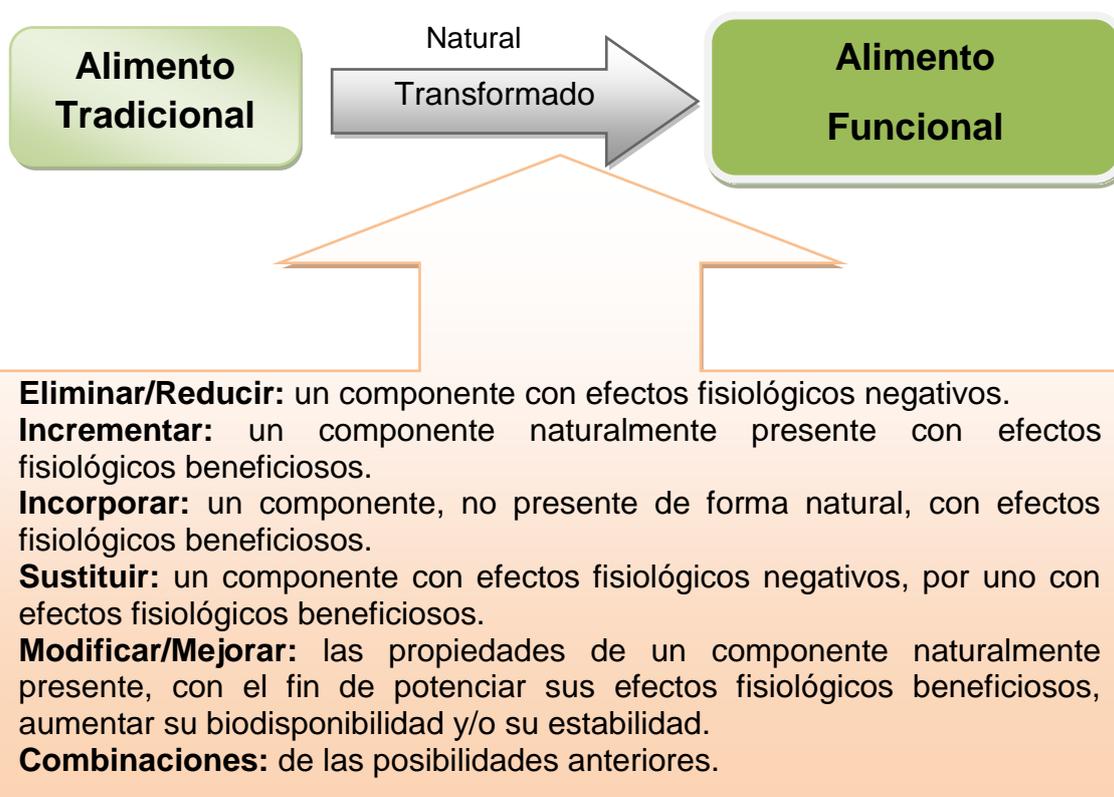
### Alimentos funcionales

Los alimentos tienen la función de aportar nutrimentos a los seres vivos; sin embargo cuando éstos a su vez contribuyen un beneficio a la salud, se les denomina “alimento funcional”. Los alimentos funcionales se originaron a partir de la década de los 80, cuando Japón comenzó a dirigir la atención pública hacia la prevención de enfermedades (Diplock A.T., et al., 1999; Arihara, 2004). En Estados Unidos y Europa el interés por los alimentos funcionales surge años más tarde. En la década de los 90, los estudios de nutrición se orientaron principalmente en las enfermedades a causa de deficiencia de nutrimentos, con el paso del tiempo estos estudios se han dirigido más hacia el potencial preventivo de enfermedades con el manejo de ciertos alimentos o de ciertos tipos de dietas. Fue el aspecto preventivo de la nutrición, el que dio nacimiento al concepto de alimento funcional (Pascal, 1996).

De acuerdo con ILSI-Europa (1995), “un alimento puede ser considerado funcional si logra demostrar científicamente que posee efectos beneficiosos para la salud sobre una o más funciones del organismo, más allá de sus propiedades nutricionales habituales, de modo tal que mejore el estado general de salud o reduzca el riesgo de alguna enfermedad o ambas cosas”.

Los alimentos funcionales deben mantener los caracteres propios de un alimento, además de permitir su inclusión en la dieta normal, no deben presentarse en forma de pastillas, comprimidos o cápsulas. Siendo así que las cantidades necesarias de consumo para manifestar sus efectos beneficiosos deberán ser los habituales en una alimentación normal (Diplock et al., 1999). Así mismo un alimento funcional puede ser un alimento natural, o un alimento al cual se le adicionó o modificó uno o varios compuestos del mismo o bien un alimento cuyo compuesto ha sido removido tecnológicamente (Figura 1). Estos

**Figura 1. Posibilidades para obtener un alimento funcional**



Adaptado de Jiménez Colmenero, 2006.

alimentos pueden ser funcionales para toda la población, o bien para cierto género y/o edad en específico (Diplock et al., 1999).

Con el desarrollo de los alimentos funcionales la relación alimento-salud toma la dimensión no de considerarse como medicamentos, sino de productos para la prevención de enfermedades, así como la reducción de condiciones tales como estrés, asma, infecciones urinarias, algunos tipos de cáncer, enfermedad de Parkinson, moduladores del colesterol, antihipertensivos, entre otras. Se ha descubierto que muchos productos alimentarios tradicionales, como las frutas, las verduras, la soya, los granos enteros, la leche y sus derivados son algunos de ellos.

Hoy en día vez son mayores los hallazgos científicos que relacionan la existencia de una gran variedad de compuestos en los alimentos con la capacidad en un individuo para alcanzar todo su potencial genético y minimizar el riesgo de enfermar. Este hecho ha generado un creciente interés de los consumidores por su salud y calidad de vida, siendo éste un elemento principal a la hora de elegir los alimentos. La adquisición de alimentos más saludables que aporte mayor bienestar está dando impulso al desarrollo del mercado de los alimentos funcionales, por lo que se considera seguirá aumentando durante el siglo XXI (Sloan, 1999).

Debido a la mayor esperanza de vida y al envejecimiento de la población, las enfermedades crónicas propias de la edad (cardiopatías, cáncer, osteoporosis, Alzheimer y degeneración macular, etc.), se consideran que siguen en aumento (OMS, 2003). Por lo que su tratamiento en general es muy costoso y a menudo no tienden a mejorar la calidad de vida. Por ello, los alimentos funcionales podrían aumentar la esperanza y mejorar la calidad de vida, además de reducir los costos en la atención clínica.

Es sumamente importante que hoy en día la investigación enfocada en los alimentos identifiquen qué tipo de alimentos pueden ser funcionales, además de aportar nutrimentos que tengan un efecto benéfico para la salud, para así con el empleo de tecnología pueda producirlos y sacarlos al mercado para tener una gran variedad de los mismos.

### La leche

La leche es un alimento que por sus características nutrimentales es considerado esencial durante las primeras etapas de vida del ser humano. Debido a esto la leche y derivados son clasificados como los más básicos y completos en composición de nutrimentos. Aporta a la dieta hidratos de carbono, proteínas, grasas, vitaminas (A, D, complejo B) y nutrimentos inorgánicos. Los compuestos de la leche además de aportar nutrimentos elementales, proporcionan protección inmunológica y sustancias biológicamente activas para neonatos y adultos (Séverin y Wenshu, 2005; Torres-Llanez et al., 2005).

La leche contiene aproximadamente 5% de lactosa, 3.2% de proteína, 4% de lípidos y 0.7% de nutrimentos inorgánicos. Las principales funciones fisiológicas que aportan los compuestos bioactivos de la leche son aportados por las proteínas y los hidratos de carbono que contiene (Shah, 2000; Séverin y Wenshu, 2005).

La leche y sus derivados son de los alimentos más estudiados. Los beneficios a la salud que contribuyen son conocidos desde los tiempos medievales. Esto es debido a que muchos productos lácteos tradicionales poseen actividad biológica. Gracias a los nutrimentos y compuestos bioactivos el consumo de leche no solamente es importante para los infantes, también lo son para los jóvenes, adultos y adultos mayores (Silva y Verdalet, 2003; Ebringer et al., 2008).

La leche contiene sustancias naturales que se encuentran presentes desde la secreción, las cuales son consideradas como bioactivas. Éstas incluyen los oligosacáridos, oligosacáridos fucosilados, hormonas, factores de crecimiento, mucinas y gangliosinas y péptidos endógenos. Los oligosacáridos, glucolípidos y glucoproteínas son considerados como antiinfecciosos debido a que contienen ácido siálico (Séverin y Wenshui, 2008).

Por otra parte, algunos derivados de la leche son importantes fuentes de nutrimentos; como por ejemplo, las proteínas del suero de quesería son bien conocidas por su alto valor nutricional, pero también por sus variadas propiedades funcionales que poseen al adicionarse como ingredientes a otros productos alimenticios (Silva y Verdalet, 2003).

Esta característica de ir más allá del efecto de aportación nutrimental ordinario, es atribuida a una gran variedad de los constituyentes de la leche como algunas proteínas, lípidos, vitaminas, nutrimentos inorgánicos, hidratos de carbono e incluso derivados de éstos (Silva y Verdalet, 2003).

Hoy en día con el uso de herramientas analíticas, bioquímicas y biológicas, la presencia de otros compuestos en los lácteos con actividad biológica sigue siendo comprobada y estudiada. Gracias al fruto de las técnicas de separación en la industria láctea aunada a la tecnología enzimática, aumenta las oportunidades de separación, concentración o modificación de los compuestos de la leche, lo que permite ser aplicado como alimento funcional y obtener suplementos alimenticios (Steijns, 2001; Séverin y Wenshui, 2008).

## Proteínas lácteas

La función primaria de las proteínas proveniente de la leche es aportar al organismo aminoácidos indispensables y nitrógeno orgánico. Las proteínas lácteas tanto como de origen humano o bovino, se dividen en caseínas y proteínas del suero (Tabla 1).

Aproximadamente el 80% de las proteínas forman parte de la caseína, las cuales contienen fosfato. La caseína y fracciones de caseína no poseen un rol fisiológico, sin embargo péptidos derivados de la caseína son los que contienen las propiedades bioactivas; éstas se denominan:  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseína (Shah, 2000).

El otro 20% son las proteínas del lactosuero pueden ser de síntesis mamaria, como la  $\alpha$ -lactoalbúmina y la  $\beta$ -lactoglobulina, que representan conjuntamente el 70% de las proteínas del lactosuero, y la lactoferrina es de transferencia sanguínea, como la albúmina y las inmunoglobulinas. Las propiedades funcionales del lactosuero vienen dadas por las de sus dos principales proteínas,  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina (Calvo, 2006). Otras proteínas más pequeñas presentes en el suero lácteo tales como la lactoferrina, lactoperoxidasa lisozima e inmunoglobulinas, también presentan función fisiológica (Tabla 2) (Shah, 2000).

Las proteínas y péptidos del lactosuero tiene diversas funciones fisiológicas (Tabla 2), tales como proteínas con unión de nutrientes inorgánicos, inmunoglobulinas, factores de crecimiento, hormonas, opioide, antimicrobiano, antibacteriano, antiinflamatorio, etc. Sin embargo los efectos fisiológicos de las proteínas del lactosuero han sido menos estudiados que las caseínas. La mayoría de las funciones de éstos se encuentran relacionadas con el sistema inmune y el digestivo.

**Tabla 1.** Concentración de las proteínas de leche

Proteínas	Concentración g/L	
	Bovino	Humano
Caseínas totales	26.0	2.7
$\alpha$ -Caseína	13.0	
$\beta$ -Caseína	9.3	
$\kappa$ -Caseína	3.3	
Proteínas totales del suero	6.3	67.3
$\beta$ -Lactoglobulina	3.2	
$\alpha$ -Lactoglobulina	1.2	1.9
Inmunoglobulinas (A, M y G)	0.7	1.3
Albúmina sérica	0.4	0.4
Lactoferrina	0.1	1.5
Lactoperoxidasa	0.03	

Adaptado de Séverin y Wenshui, 2005.

**Tabla 2.** Efecto funcional de las proteínas y péptidos del lactosuero

<b>Proteína o péptido</b>	<b>Efecto funcional</b>
Proteína de suero total	Anticarcinogénico Inmunoestimulador Longevidad Hipocolesterolémico
$\beta$ -Lactoglobulina	Función digestiva
$\beta$ -Lactorfina	Agonista opioide
$\alpha$ -Lactoalbúmina	Anticarcinogénico
$\alpha$ -Lactorfina	Agonista opioide
Lactoferrina	Antimicrobiano Transporte y regulación de hierro Inmunoestimulador Crecimiento y proliferación celular Anticarcinogénico
Lactoferricina	Antimicrobiano
Inmunoglobulinas	Inmunidad pasiva
Lactoperoxidasa	Antibacteriano
Factores de crecimiento	Diferenciación y crecimiento celular Reparación y protección de la mucosa intestinal Reparación de lesiones
Albúmina sérica	Agonista opioide

Fuente: Baró et al., 2001.

## Péptidos bioactivos

Toda fuente de proteína alimentaria es capaz de aportar péptidos. Dentro de los alimentos que proporcionan péptidos funcionales, se encuentran las de origen de soya, sardina, maíz, etc. (Yamamoto, 1999), sin embargo las proteínas de origen lácteo son la fuente principal de aportar péptidos con actividad biológica; esto se debe a la secuencia que proporciona el mismo (Gobbeti et al., 2004; Séverin, y Wenshui, 2008).

Con la ayuda de enzimas proteolíticas la proteína se absorbe en forma de péptido no mayor de 3 aminoácidos, los cuales a su vez son hidrolizados por di y tripeptidasas hasta terminar como aminoácidos, sin embargo algunos logran pasar intactos por la circulación sanguínea y llegan al sitio de acción donde tienen la función biológica (Robert y Zaloga, 1994; Baró et al., 2001; Segura-Campos et al., 2010).

Los péptidos bioactivos se han definido como fragmentos de proteínas que tienen un impacto positivo en las funciones o condiciones del cuerpo, influenciando así la salud del mismo (Tabla 3) (Kitts y Weiler, 2003; Torres-Llanez, et al., 2005). Su actividad está basada en la composición y secuencia de los aminoácidos. La secuencia de aminoácidos con actividad funcional puede ser constituida de 2-20 residuos (Meisel y FitzGerald, 2003; Korhonen y Pihlanto, 2006).

Los péptidos bioactivos de leche se encuentran inactivos dentro de la proteína intacta, para tener función fisiológica en el cuerpo existen tres maneras de activarse: (a) hidrólisis enzimática por medio de enzimas digestivas, (b) procesamiento del alimento y (c) protéolisis por medio de enzimas derivadas de bacterias ácido lácticas o plantas (Torres-Llanez et al., 2005; Haque y Chand 2006, Korhonen y Pihlanto, 2006).

**Tabla 3.** Péptidos bioactivos de leche y sus efectos beneficiosos en la salud

<b>Péptidos</b>	<b>Efectos beneficiosos</b>
Inmunomoduladores	Estimulan respuesta inmune
Inhibidores de la enzima convertidor de angiotensina	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Antioxidantes	Previenen enfermedades degenerativas y envejecimiento
Reguladores del tránsito intestinal	Mejoran digestión y absorción
Reguladores de la proliferación celular	Reducen la proliferación de tumores cancerígenos
Antimicrobianos	Reducen el riesgo de infecciones
Quelantes	Mejoran la absorción de minerales y metales
Hipocolesterolémicos	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Anticoagulantes	Reducen el riesgo de padecer trombos

Adaptado de Vioque et al., 2006.

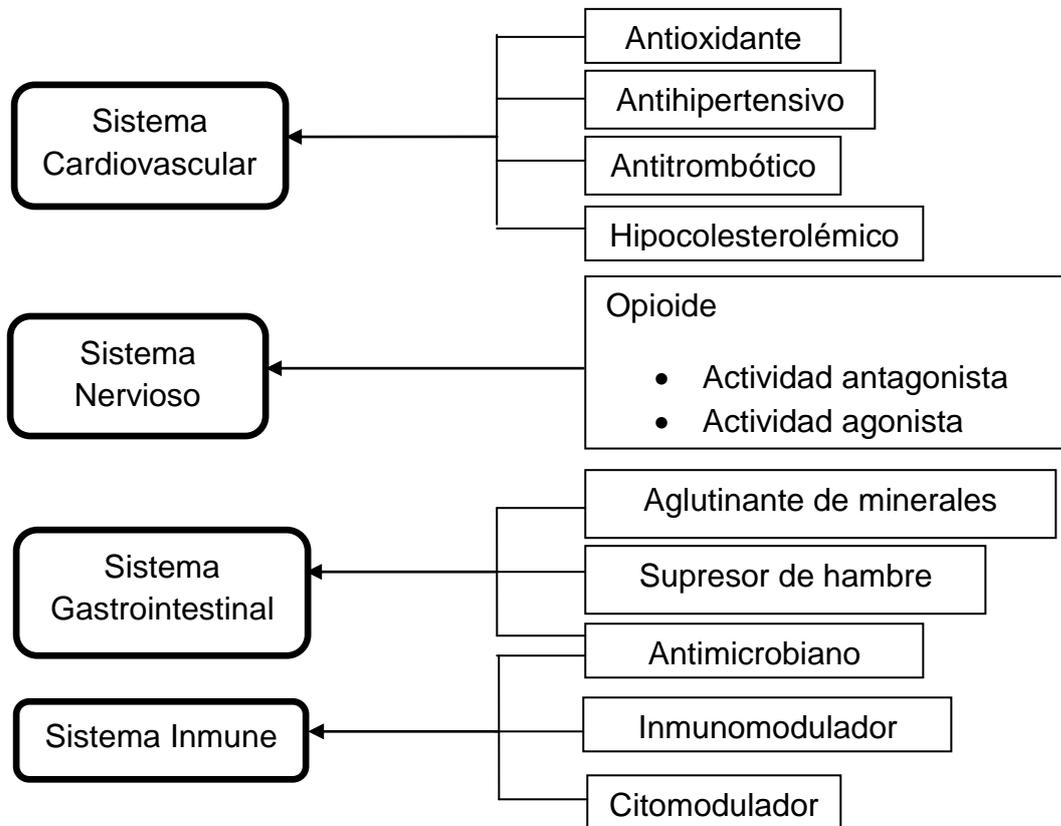
Para que exista un efecto fisiológico *in vivo* es necesario que los péptidos bioactivos sean liberados durante la digestión y que alcancen un sitio donde ejercen su acción en el tracto intestinal o después de su reabsorción en los órganos periféricos. Se ha demostrado la formación de péptidos con actividad biológica en la digestión *in vivo* como en *in vitro*, estos péptidos también son liberados durante la elaboración de productos lácteos (Torres-Llánez et al., 2005). Las secuencias de aminoácidos ya caracterizados tienen función: antihipertensiva, antitrombótica, antimicrobiana, inmunomoduladora, opioide y antioxidante Figura 2 (Pihlanto y Korhonen, 2003; Korhonen y Pihlanto, 2006).

### Hidrólisis Enzimática

La producción de fragmentos de péptidos bioactivos a partir de proteínas lácteas ocurre en el tracto gastrointestinal por medio de la pepsina y enzimas pancreáticas (tripsina, quimotripsina, carboxi y aminopeptidasas) durante la digestión gástrica. Los efectos fisiológicos de los péptidos bioactivos dependen de la habilidad de alcanzar el sitio de acción, el cual son absorbidos a través del epitelio intestinal y viajan a los órganos periféricos, como se explica en la Figura 3 (Schlimme y Meisel, 1995; Vermeirssen et al., 2004; Segura-Campos et al., 2010).

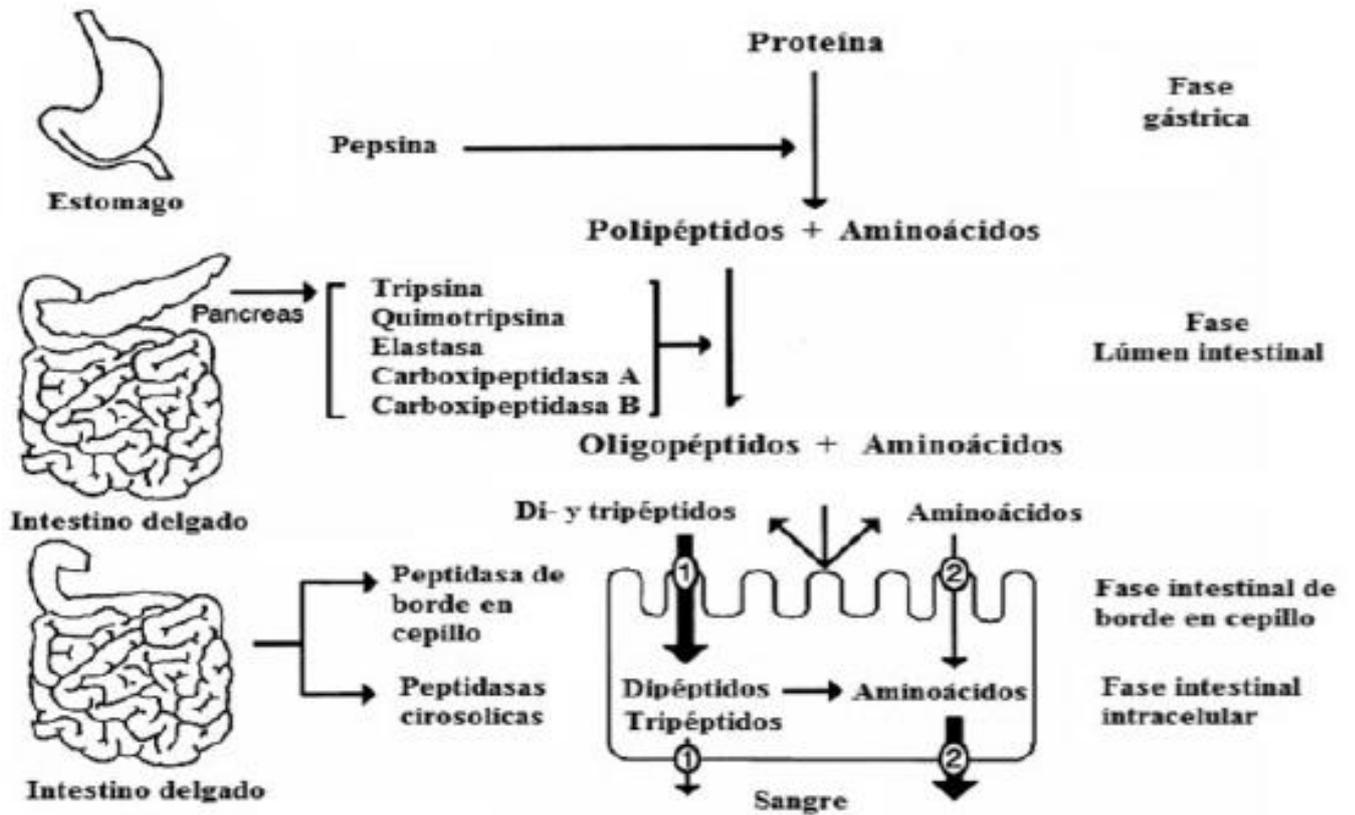
La mayoría de los péptidos bioactivos elaborados *in vitro* por medio de sistemas enzimáticos (pepsina y tripsina) son producidos con el fin de conocer su funcionalidad, y así más adelante poder ser estudiados *in vivo*. Los péptidos antihipertensivos y las caseinofosfopeptidasas son comúnmente producidas a partir de tripsina. Otras enzimas digestivas y la combinación de enzimas proteolíticas, tales como la alcalasa, quimiotripsina, pancreatina, pepsina, termolisina, etc., al igual que enzimas provenientes de bacterias y hongos, también se están utilizando para la generación de péptidos con actividad biológica (Hajirostamloo, 2010).

**Figura 2.** Funciones fisiológicas de los péptidos bioactivos derivados de leches



Fuente: Korhonen y Pihlanto, 2006.

**Figura 3.** Barreras potenciales de activación o inactivación de las proteínas durante la digestión y absorción gastrointestinal



Fuente: Segura-Campos et al., 2010.

## Procesamiento de alimentos

Los cambios que ocurren tanto químicos como estructurales durante el procesamiento de alimentos pueden dar fruto a péptidos bioactivos. El calentamiento y/o el tratamiento con álcali son procesos que generan enlaces covalentes inter e intramoleculares resistentes a la hidrólisis que ocurre en el organismo. Estos procesos promueven conversiones de L-aminoácidos a D-isómeros, lo que conlleva a péptidos con enlaces de carácter más resistentes que les permite de cierta manera ser más íntegros en los procesos de absorción en el organismo, lo que conlleva a que se obtenga un mayor efecto bioactivo del péptido (Hajirostamloo, 2010).

Estos péptidos son generados durante la manufactura de productos lácteos y son ingeridos naturalmente en la dieta. Los hidrolizados a partir de las proteínas de leche es un ejemplo de ellos. Éstos son utilizados en las fórmulas de leche hipoalérgicas para niños; o bien con aplicación nutricional al constituirse exclusivamente de péptidos potencialmente bioactivos. Otro ejemplo es el queso, el cual contiene naturalmente fosfopéptidos. Durante la maduración del mismo ocurre una proteólisis secundaria conlleva a la formación de varios péptidos antihipertensivos (Torres-Llánez, et al., 2005; Hajirostamloo, 2010).

## Fermentación microbiana

Las bacterias ácido lácticas se caracterizan por ser Gram-positivas, no esporuladas presentes naturalmente en alimentos crudos y en el tracto gastrointestinal del ser humano (Sybesma et al., 2006).

Las bacterias ácido lácticas son comúnmente utilizadas en la salud humana ya que su ingestión puede proteger contra varias infecciones virales estimulando el sistema inmune. Vinderola et al., (2000) demuestra que éstas actúan en la prevención del cáncer de colon.

En la industria alimentaria las bacterias ácido lácticas son utilizadas para aumentar su vida de anaquel de ciertos alimentos evitando el crecimiento microbiano, así como mejorar las características organolépticas del mismo (Leroy y De Vuyst, 2004).

Los cultivos iniciadores de bacteria ácido lácticas son aquellos que se adicionan a los alimentos crudos para acelerar el proceso de fermentación, mientras que los cultivos no iniciadores son aquellos que se producen durante la maduración de un alimento (Leroy y De Vuyst, 2004). Los cultivos iniciadores y no iniciadores que son utilizados en la industria láctea son altamente proteolíticos, permitiendo generar péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres (*Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*).

Este sistema está compuesto por proteinasas extracelulares que se enlazan a la pared celular, al igual que peptidasas intracelulares (endopeptidasas, aminopeptidasas, tripeptidasas y dipeptidasas). Las proteinasas extracelulares causan la degradación de la caseína en oligopéptidos. Cuan mayor sea la cadena de oligopéptidos, las peptidasas intracelulares darán resultado a una mejor producción de péptidos con actividad biológica (Torres-Llanez et al., 2005; Hajirostamloo, 2010).

La manera más efectiva de aumentar la concentración de péptidos con actividad biológica a partir de productos lácteos es fermentándolos con cultivos altamente proteolíticos de bacterias ácido lácticas. Es por esto que es importante el cultivo que se seleccionará; no debe de elegirse un cultivo con mucha actividad proteolítica debido a que el producto puede destruirse, sino que debe ser exacto para proporcionar altas concentraciones de péptidos bioactivos (Hajirostamloo, 2010).

Varios estudios realizados con péptidos bioactivos generados a partir de la proteólisis microbiana han tenido actividad antihipertensiva, inmunomoduladoras, antioxidante, antimutagénico, etc. (Shlimme y Meisel,

1995; Gobetti et al., 2002; Korhonen y Pihlanto, 2003; Korhonen y Pihlanto, 2004; Hernández-Ledesma et al., 2005).

El género *Lactococcus* (L.), tiene cinco especies, de las cuales sólo *L. lactis* es de interés tecnológico. Dentro de la especie *lactis* existen tres subespecies: *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris*, *L. lactis* ssp. y *hordniae*. Debido a su multifuncionalidad, las primeras dos son utilizadas principalmente para la fermentación de alimentos (Leroy y De Vuyst, 2004).

Con respecto a la multifuncionalidad de las bacterias *L. lactis*, éstas contribuyen en diferentes aspectos tales como: producción de sustancias antimicrobianas (patógenos), aspectos nutricionales y/o de salud (probióticos) y pueden ofrecer ventajas organolépticas en algunos productos alimenticios (Leroy y De Vuyst, 2004; Torres-Llanez, et al., 2005).

*L. lactis* se encuentran naturalmente en las superficies de plantas y en la leche. Las bacterias ácidos lácticas provenientes de plantas se especula que son fuentes cepas naturales de la leche. Estas mismas cepas provenientes de plantas se espera tengan más capacidades en comparación de las provenientes de leche. Un ejemplo sería que las cepas derivadas de plantas, muestran una mayor tolerancia al estrés que las de origen lácteo. Por lo que se concluye que las cepas de origen vegetal pudieran tener funciones además de las de mejorar las características organolépticas de los alimentos (Nomura et al., 2006).

### Péptidos opioides

Los péptidos opioides son aquellos que farmacológicamente tienen similitudes al opio (morfina). Los receptores de los péptidos opioides se encuentran en el sistema nervioso, endócrino, inmune y en el tracto gastrointestinal. Los péptidos opioides atípicos derivados de proteínas de leche presentan efecto antagonista y agonista. Los derivados de las  $\beta$ -caseínas son conocidos como casoxinas y casomorfina, mientras que las lactofinas son

provenientes del lactosuero (Torrez-Llanez et al., 2005; Korhonen y Pihlanto, 2006; Séverin y Wenshui, 2008).

Cuando los péptidos opioides se inyectan directamente al flujo sanguíneo, éstos inducen un efecto analgésico y sedativo al sistema nervioso central, dando un efecto agonista. En contraste a esto, existen péptidos llamados casoxinas, derivados de la  $\kappa$ -caseína; causan un efecto antagonista, inhibiendo el efecto de la morfina (Loukas, 1983).

También tienen efecto en la motilidad del tracto digestivo. Daniel et al. (1990) demostró que las casomorfina prolongan el tiempo del tránsito gastrointestinal, por lo que puede ayudar a eliminar la diarrea.

### Péptidos antihipertensivos

La hipertensión es una enfermedad crónico degenerativa que provoca complicaciones a la salud tales como infartos al corazón, arritmias, función anormal del riñón, enfermedades coronarias, por mencionar algunas. Es importante que la gente conozca que no solamente los medicamentos tienen efecto sobre la hipertensión, también los alimentos, y la leche es uno de ellos.

La enzima principal en la regulación de la presión arterial es la angiotensina-I-convertidora (ECA). Esta enzima remueve dos aminoácidos de la angiotensina-I lo que hace que se convierta en angiotensina-II, causando vasoconstricción, lo cual provoca que aumente la presión. Esta enzima también hidroliza bradikinina, un vasodilatador, por lo que su efecto es disminuir la presión arterial.

Los inhibidores de esta enzima (ECA) se llaman péptidos antihipertensivos por lo que su función es el de disminuir la presión arterial al

no permitir que la enzima angiotensina-I se convierta en angiotensina-II (Korhonen y Pihlanto, 2006).

Estudios realizados *in vitro* con péptidos a partir de leche fermentada por Hernández-Ledesma *et al.* (2005) encontró una actividad moderada de ECA-inhibitoria. Estudios hechos por Nakamura (1995) en ratas, determinaron los dos péptidos que tienen este efecto, Val-Pro-Pro y Ile-Pro-Pro. Estos péptidos al pasar por el sistema digestivo y después de ser absorbidos inhiben la producción de angiotensina-II en sangre.

González-Córdova *et al.* (2010) y Rodríguez-Figueroa (2010) fermentaron leche con bacterias ácido lácticas, *Lactobacillus* y *Lactococcus*, respectivamente, y encontraron que los extractos acuosos a partir de estas leches fermentadas poseen actividad inhibidora de la ECA-II.

### Fosfopéptido caseína

Los caseinofosfopéptidos juegan un papel importante en la absorción de calcio en el intestino delgado; esto es debido a la presencia de múltiples residuos de fosfatos, los cuales los convierten en buenos agentes quelantes de calcio. Además de que su presencia en la cavidad oral promueve la remineralización del esmalte de los dientes (Meisel y FitzGerald. 2003).

Naito *et al.* (1972) experimentó en ratas y descubrió que los fosfopéptidos a partir de caseína ayudan a prevenir la precipitación del fosfato de calcio *in vitro*, al igual que en el lumen del intestino delgado; por lo que esto ayuda a que aumente el calcio soluble en el intestino.

También ayudan a crear micelas de caseínas termodinámicas estables sobresaturadas de calcio y fosfato, lo que ayuda a que se estabilicen durante la fermentación (proceso caliente) en la leche (Holt y Horne, 1996).

Una vez que se descubrió que los caseinofosfopéptidos tienen la capacidad de quelar y solubilizar nutrientes inorgánicos, éstos se han considerado ser fisiológicamente beneficiosos en la prevención de la osteoporosis, caries dental, hipertensión y anemia (Korhonen y Pihlanto, 2006).

### Péptidos antitrombóticos

La trombosis se define como una condición patológica en el que se presenta una actividad inapropiada de un mecanismo hemostático dando como resultado la formación de coágulos y trombos en las arterias, venas e incluso en los ventrículos del corazón. El estilo de vida y los factores genéticos son agentes que pueden promover la trombosis y en consecuencia, la arterosclerosis (Hayes et al., 2007).

La coagulación de la sangre y la coagulación de la leche son dos procesos fisiológicos importantes, esto es debido a que contienen estructuras homólogas; siendo la  $\kappa$ -caseína bovina en la leche y el fibrinógeno cadena- $\gamma$  en el ser humano. Estas similitudes fueron encontrados por Jollès et al. (1978). El fragmento de la  $\kappa$ -caseína llamada casopiastrina, muestra actividad antitrombótica al inhibir la unión del fibrinógeno con las plaquetas (Brody, 2000).

### Péptidos inmunomoduladores

Se han encontrado diversos péptidos inmunomoduladores a partir de la caseína, tales como  $\alpha_s$ -caseína y  $\beta$ -caseína. Éstos péptidos estimulan la proliferación y maduración de las células T y las células macrófagas. Ésto

beneficia a los recién nacidos para que tengan defensas contra algunas bacterias, en especial las bacterias entéricas (Clare y Swaisgood, 2000; Van, 2002).

Un estudio realizado por Migliore-Samour et al. (1989) encontró un efecto directo de actividad inmunomoduladora contra *Klebsiella pneumoniae*.

### Lactoferrina

La lactoferrina es una proteína de tamaño mucho menor que la lactoalbúmina, la cual es fijadora de hierro. La lactoferrina de la leche está muy poco saturada con hierro, ya que una de sus misiones es la protección del recién nacido mediante el secuestro del hierro, haciendo éste indisponible para las bacterias y para la formación de radicales libres en las reacciones de oxidación (Calvo, 2006).

Debido a su alta afinidad con el hierro, la lactoferrina logra evitar que las bacterias patógenas no consigan hierro, por lo que se puede concluir que otra función que tiene es de bactericida y bacteriostático; causando la liberación de las moléculas lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas teniendo un efecto antibiótico. Inhibe el crecimiento de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus subtilis* (Batish et al. 1988; Payne et al. 1990; Saito et al. 1991).

### Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas son pequeñas proteínas que forman parte del sistema de defensa contra microorganismos. Éstas se encuentran presentes

mayormente en el calostro, aproximadamente 100 veces mayor, dando este efecto protector contra infecciones para los bebés (Séverin y Wenshui, 2008).

En la leche de vaca, aproximadamente el 80% de la inmunoglobulinas presentes en la leche son IgG. Mientras que en la leche humana las IgA son las de mayor concentración (Calvo, 2006).

Diversos estudios clínicos afirman que el uso de péptidos inmunomoduladores ayudan a combatir contra patógenos orales y gastrointestinales, tales como *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Helicobacter pylori*, *Criptosporidium*, *Eschericia coli*, entre otros (Bogsted et al., 1996; Weiner et al., 1999; Bostwick et al., 2000).

### Péptidos Antioxidantes

En un alimento los radicales libres causan la oxidación de lípidos, desarrollando rancidez y reduciendo la vida de anaquel del alimento; en los seres humanos y consumidores de productos que los contienen, los radicales libres modifican el ADN, proteínas y otras pequeñas moléculas celulares, lo cual juega un rol significativo en el desarrollo de enfermedades (Peng et al., 2009; Alvarado y Guerra, 2010).

Los péptidos con actividad antioxidante son aquellos que normalmente tienen un peso molecular menor a 3 kDa; esto se puede atribuir a los sistemas modelo de oxidante-antioxidante donde comprueban que entre menor tamaño sea el péptido, mejor actividad antioxidante tendrá, en comparación a los péptidos y proteínas de mayor tamaño (Mburu et al., 2010). Chen et al. (1998) afirma que los péptidos antioxidantes pueden actuar como quelantes de iones metálicos, inhibidores de especies sencillas de oxígeno, o como secuestradores de radicales hidroxilos.

Estudios recientes han demostrado que después de la hidrólisis proteica, ciertos péptidos resultantes pueden actuar como antioxidantes en sistemas modelo, pudiendo ser empleados como antioxidantes naturales en productos alimenticios (Alvarado y Guerra, 2010); esto sería útil debido a que antioxidantes sintéticos utilizados, tales como hidroxibutilanisol (BHA) y el hidrobutiltolueno (BHT) comúnmente utilizados para prevenir la peroxidación de lípidos, son considerados carcinogénicos, ya que causan daños al ADN (Sadat et al., 2011). Debido a esto la investigación se ha enfocado en el estudio de actividad antioxidante en aminoácidos y péptidos para comprender el mecanismo antioxidante.

Las proteínas e hidrolizados proteicos de diversas fuentes alimentarias han mostrado tener actividad antioxidante (Wang y Xiong, 2005; Sakanaka et al., 2004; Je et al., 2005; Mendis et al., 2005). Los hidrolizados de albúmina de huevo, yema de huevo (Sakanaka et al., 2004), caseína (Suetsuna et al., 2000), suero lácteo (Peña-Ramos et al., 2004), gelatina de pescado (Kim et al., 2001), soya y proteína miofibrilar han inhibido la oxidación de lípidos y ácidos grasos insaturados en diferentes sistemas modelos (Wang y Xiong, 2005).

Un estudio realizado por Cumby et al. (2008) testifica que la presencia de aminoácidos aromáticos ayudan y mejoran la capacidad antioxidante, tal es el caso de la tirosina, que gracias a la presencia del hidroxilo estabiliza radicales libres con su capacidad de donación de un hidrógeno.

Estudios realizados con antioxidantes sintéticos afirman que la histidina presenta una fuerte actividad secuestrante de radicales libres, gracias a su habilidad de donar protones del grupo imidazol (Peña-Ramos et al., 2004; Mendis et al., 2005; Wang et al., 2006).

Estudios recientes muestran que péptidos antioxidantes pueden ser liberados por hidrólisis de enzimas digestivas y por medio de la fermentación leche por bacterias ácido lácticas (Korhonen y Pihlanto, 2003). Los péptidos derivados de leche con actividad antioxidante son compuestos por 5 a 11

aminoácidos, los cuales pueden incluir en su secuencia: aminoácidos hidrofóbicos, prolina, histidina, tirosina o triptófano (Pihlanto, 2006).

Suetsuna et al. (2000) separó un péptido a partir de caseína hidrolizada con la secuencia Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu, la cual tuvo una fuerte capacidad secuestrante de radicales libres. Evaluando distintas secuencias a partir de este péptido, se concluyó que la terminación Glu-Leu es importante para la actividad antioxidante, además de atribuirse la capacidad antioxidante de péptidos de tamaño corto (Suetsuna et al., 2000; Mburu et al. 2010)

Virtanen et al. (2007) estudió la actividad antioxidante en leches fermentadas mediante diferentes cepas de bacterias ácido lácticas; donde concluye que la capacidad antioxidante depende del origen de la cepa. En otro estudio (Gupta et al., 2009) encontró actividad antioxidante en el queso tipo cheddar fermentado por *Lactobacillus*.

En un estudio realizado por Peng et al. (2009) aislaron un hidrolizado de proteína de suero mediante un tratamiento enzimático empleando alcalasa, donde se obtuvo cuatro fracciones con péptidos de diferentes pesos moleculares. La fracción con péptidos en el rango de 0,1 a 2,8 kDa mostró tener una capacidad reductora de radicales libres significativamente mayor que las otras fracciones con péptidos de mayor de 2.8 kDa.

Erdmann et al. (2008) menciona que la actividad antioxidante de los péptidos derivados del suero lácteo se encuentra relacionada con la presencia de cisteína; la cual promueve la síntesis de glutationato, un potente antioxidante intracelular. Bayram et al. (2008) obtuvieron resultados similares comparando la actividad antioxidante de las proteínas del suero con la de sus hidrolizados. Sus resultados sugieren que la actividad antioxidante es mayor en los péptidos provenientes del lactosuero.

En consecuencia se puede destacar que tanto la composición de aminoácidos como la secuencia de los péptidos son críticas para su actividad antioxidante. Así mismo el tamaño de los péptidos liberados en la hidrólisis

también parece estar relacionado a la capacidad antioxidante de los hidrolizados proteicos.

### Reacciones de oxidación

Los radicales libres se generan constantemente en los seres vivos como resultado de las reacciones metabólicas, contaminación, exceso de exposición solar, ejercicio muy intenso, malos hábitos alimenticios, estrés, consumo de tabaco, de alcohol y ciertos medicamentos (Lobo et al., 2010).

Los radicales libres se definen como cualquier molécula o átomo que contiene un electrón desapareado en su último orbital. Esto los hace inestables y altamente reactivos, por lo que pueden robar electrones de otras moléculas estables y así logran su estabilidad (Tabla 4). Aunque la vida biológica de un radical libre es de microsegundos, logra reaccionar con lo que tenga a su alrededor, tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Matill, 1947; Vioque et al., 2006; Lobo et al., 2010).

En los seres vivos los radicales libres se generan a partir de dos sustancias importantes: el oxígeno en estado fundamental ( $O_2$ ) y el óxido nítrico (NO) (Rover, 2001). Dichas sustancias en el metabolismo producen compuestos altamente reactivos llamados especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas de nitrógeno (ERN).

**Tabla 4.** Mecanismo de la oxidación de lípidos

Iniciación	$\text{RH} + \text{iniciador} \longrightarrow \text{R}^\bullet + \text{H}^\bullet$
	$\text{RH} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{ROO}^\bullet + \text{H}^\bullet$
Propagación	$\text{R}^\bullet + \text{O}_2 \longrightarrow \text{ROO}^\bullet$
	$\text{ROO}^\bullet + \text{RH} \longrightarrow \text{ROOH} + \text{R}^\bullet$
	$\text{ROOH}^\bullet \longrightarrow \text{RO}^\bullet + \text{OH}^\bullet$
Terminación	$\text{ROO}^\bullet + \text{R}^\bullet \longrightarrow \text{ROOR}$
	$\text{R}^\bullet + \text{R}^\bullet \longrightarrow \text{RR}$
	$\text{ROO}^\bullet + \text{ROO}^\bullet \longrightarrow \text{ROOR} + \text{O}_2$

RH lípido insaturado, R<sup>•</sup> radical libre, ROO<sup>•</sup> radical peróxido, ROOH radical hidroperóxido.

Fuente: Nawar, 1996.

Diversos estudios confirman que este daño se encuentra relacionado con el desarrollo de diversas enfermedades crónico degenerativas, envejecimiento e incluso cáncer. El estrés oxidativo es el daño producido por la oxidación debido al desbalance entre la producción de radicales libres y antioxidantes (Matill, 1947; Vioque et al., 2006; Lobo et al., 2010).

### Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas lo suficientemente estables para donar un electrón y así retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas (Lobo et al., 2010). Los antioxidantes deben demostrar tener alguna de las tres propiedades: eliminación de la formación de radicales libres (por secuestro de metales o por inhibición de las enzimas generadores de radicales libres), supresión o desactivación de radicales libres con formación de un producto estable, o participación en procesos de reparación de daños oxidativos, como se explica en la Tabla 5 (Bourne y Rice-Evans, 1999; Ribeiro, 2005).

Los organismos poseen mecanismos de defensa antioxidante, contra los radicales libres, los cuales son capaces de proteger y prevenir el daño que causan a las moléculas. El grupo primario de defensa es de origen endógeno, en las que se encuentra las enzimas con acción antioxidante tales como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, etc., éstas son capaces de neutralizar las especies reactivas de oxígeno. La segunda línea de defensa son moléculas de origen exógeno incorporadas en la dieta, son de bajo peso molecular, y se encargan de eliminar los radicales libres. Éstas incluyen el ácido ascórbico (vitamina C), tocoferoles (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, polifenoles, etc. (Issa et al., 2006; Lorenzo et al., 2009).

### Evaluación de la actividad antioxidante

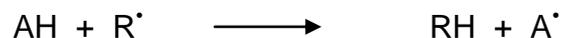
La evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* o *in vivo* puede ser realizada a través de diferentes métodos (Antolovich et al., 2002). La

**Tabla 5. Mecanismo de acción de los antioxidantes**

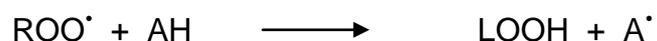
---

---

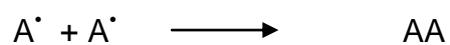
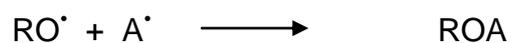
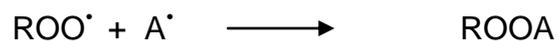
El antioxidante dona un átomo de hidrógeno a un radical libre, convirtiéndolo en un producto estable.



Antioxidantes reaccionando con radicales peróxido para detener la reacción en cadena de la oxidación lipídica y la descomposición de hidroperóxidos.



Los radicales formados por el antioxidante (A) durante las etapas anteriores pueden reaccionar con otros radicales para formar compuestos no radicales.



Fuente: Nawar, 1996

evaluación *in vitro* de la capacidad antioxidante es aplicada como una rápida estimación de la posible actividad que un compuesto podría presentar *in vivo* o al formar parte de un alimento. Existen numerosos métodos para evaluar la capacidad antioxidante *in vitro*, y según la reacción que involucran, pueden ser ensayos que incluyen reacciones en las que se transfiere un electrón o un átomo de hidrógeno.

Los ensayos enfocados en la transferencia de un electrón se basan en una reacción de reducción en la que un sustrato toma un electrón del compuesto antioxidante (agente reductor). La reducción del sustrato oxidante causa una alteración de color que se utiliza como medida del avance de la reacción y de la capacidad antioxidante de la muestra.

Algunos de los métodos que se basan en esta reacción son: el ensayo de la capacidad secuestrante del radical ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico), también llamado ensayo de la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC); el ensayo del poder reductor del ión férrico (FRAP); ensayo de la capacidad reductora del Cu (II); y el método de la capacidad secuestrante del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (Thaipong et al., 2006).

Los ensayos basados en reacciones de transferencia de un átomo hidrógeno usan un generador sintético de radicales libres, un sustrato oxidable (marcador) y un antioxidante donador de átomos de hidrógeno, por lo que se produce una competencia entre el antioxidante y el sustrato por los radicales libres. De este modo, la oxidación del sustrato es inhibida o retardada y esto se relaciona con la capacidad antioxidante del compuesto. Incluidos en estos métodos están el ensayo de ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), el ensayo de decoloración de la crocina, entre otros (Huang et al., 2005; Thaipong et al., 2006).

Por otro lado, también existen métodos que cuantifican los productos formados durante la peroxidación lipídica, los que en presencia de un antioxidante disminuyen. Algunos de estos métodos son el ensayo de la

oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDLs) y el ensayo del ácido tiobarbiturico (TBARS).

Debido a las particularidades de los métodos es extremadamente difícil comparar los resultados entre los diferentes ensayos (Huang, D., et al., 2005).

En todos los casos, el método más sencillo de medir la actividad antioxidante es el TEAC, el cual se basa en: (i) disolver el radical cromógeno en un medio apropiado, (ii) adición del antioxidante, (iii) medición fotométricamente de la reducción del radical cromógeno al observar la disminución de la absorbancia en un tiempo determinado, (iv) para así correlacionar la curva de concentración-respuesta con el estándar antioxidante (Trolox) (Arnao, 2000).

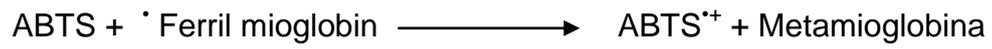
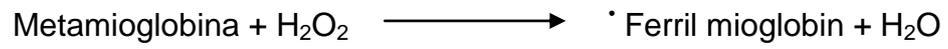
#### Método del ABTS

Es uno de los métodos más utilizados debido a su estabilidad y solubilidad, tanto en medios orgánicos o acuosos. Este radical cromógeno artificial es generado de su precursor y una de sus ventajas es que presenta diferentes picos de máxima absorción de 415 nm, 752 nm y 842 nm en medios acuosos; y de 414 nm, 730 nm y 873 nm en etanol (Arnao, 2000).

Este método se basa en atrapar aniones de vida larga como el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS). El compuesto cromógeno ABTS presenta color azul/verde al reaccionar enzimáticamente usando peroxidasa y mioglobina, como se explica en la Tabla 6 (Miller y Rice-Evans, 1996) o químicamente utilizando dióxido de manganeso o persulfato de potasio (Cuadro 4) (Re et al., 1999).

Al encontrar un antioxidante en el medio se retarda la formación del radical libre, resultando una disminución de la absorbancia. En esta técnica se utiliza al ácido (+/-)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico (Trolox)

**Tabla 6.** Generación del radical ABTS<sup>•+</sup> por medio de mioglobina y peróxido de hidrógeno



Fuente: Miller y Rice-Evans, 1996.

como estándar, el cual es un antioxidante análogo acuoso de la vitamina E (Arnao, 2000).

Este método es aplicable para sistemas acuosos y lipofílicos. Proporciona una manera directa de comparación de la actividad antioxidante de soluciones de sustancias puras; además de que puede ser utilizado en plasma y suero humano, al igual que saliva y otros fluidos humanos, extractos de plantas, bebidas, extractos de alimentos, etc. (Miller y Rice-Evans, 1996; Re et al., 1999).

### III. HIPOTESIS

Los extractos acuosos obtenidos de leches fermentadas con cepas de *Lactococcus lactis* aisladas de diferentes orígenes contienen péptidos con actividad antioxidante.

### IV. OBJETIVOS

#### Objetivo General

Determinar la capacidad antioxidante en extractos acuosos menores a 3 kDa de leches fermentadas con cepas de *Lactococcus lactis*.

#### Objetivos Específicos

1. Estandarizar el método del ABTS para evaluar la capacidad antioxidante en extractos acuosos obtenidos de leches fermentadas.
2. Determinar el porcentaje de inhibición del radical ABTS para las leches fermentadas por *Lactococcus lactis*.
3. Obtener el porcentaje de actividad antioxidante para cada cepa de *Lactococcus lactis*.
4. Evaluar el potencial antioxidante para las concentraciones de 1 y 0.5 mg de los extractos acuosos y establecer que cepas presentan mayor capacidad antioxidante de acuerdo al origen de aislamiento.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas de *Lactococcus lactis*

Se utilizaron 20 cepas de *Lactococcus lactis* del Laboratorio de Calidad, Autenticidad y Trazabilidad de los Alimentos, DTAOA-CIAD, A.C. las cuales fueron aisladas previamente de tres fuentes: Alimentos elaborados con leche cruda (queso Chihuahua, Menonita y requesón), alimentos vegetales (betabel, mazorcas, hojas de maíz y ejotes) y cultivos iniciadores comerciales (Danisco™ y Rhodia™) (Tabla 7).

### Reactivos

Los reactivos utilizados fueron: solución de ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS) con peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), solución de mioglobina 100X, dodecil sulfato de sodio (SDS 1%), solución de ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametil-croman-2 carboxílico (Trolox), AOX Assay buffer: buffer de fosfato salino (PBS, pH 7.4) de la marca Zenbio, agua ultrapura (MilliQ).

### Elaboración de leches fermentadas

Leche desnatada en polvo Organic Valley<sup>1</sup> USDA Organic Grade A (La Farge, WI, EUA) se reconstituyó (10% p/v) y esterilizó (100°C durante 20 min). A partir de esta leche, cada una de las cepas de *Lactococcus lactis* se inoculó individualmente (0,1 mL de inóculo en 10 mL de leche) y se incubaron a 37°C durante 24 horas bajo atmósfera de CO<sub>2</sub>. Este procedimiento se repitió dos veces para obtener pre-inóculos frescos (10<sup>6</sup>–10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) de las cepas bajo

**Tabla 7.** Fuentes de cepas *Lactococcus lactis* a partir de diferentes nichos ecológicos

<b>CÓDIGO</b>	<b>NICHO</b>	<b>ORIGEN DE AISLAMIENTO</b>
B7	Vegetal	Betabel
J6	Vegetal	Ejote
M1	Vegetal	Mazorca
M5	Vegetal	Hoja de Maíz
M7	Vegetal	Hoja de Maíz
Q1	Lácteo	Queso Chihuahua
Q2	Lácteo	Queso Chihuahua
Q3	Lácteo	Queso Menonita
Q5	Lácteo	Queso Chihuahua
R1	Lácteo	Requesón
R7	Lácteo	Requesón
C1	Comercial	Danisco
Z1	Comercial	Danisco
Z2	Comercial	Danisco
E1	Comercial	Rhodia
E3	Comercial	Rhodia
P4	Comercial	Danisco
K1	Comercial	Danisco
K3	Comercial	Danisco
K5	Comercial	Danisco

Fuente: Gutiérrez-Méndez, *et al.* (2008).

estudio. Se prepararon leches fermentadas a partir de cada uno de los pre-inóculos al 3% (v/v) en leche en polvo desnatada reconstituida estéril, y se incubaron a 37°C durante 24 horas bajo atmósfera de CO<sub>2</sub>. El proceso fermentativo se detuvo a las 6, 12, 24 y 48 horas por pasteurización a 75°C durante 1 min (Muguerza et al.,2006).

### Obtención de extractos peptídicos solubles en agua a partir de leches fermentadas

Los extractos acuosos se obtuvieron aplicando la metodología descrita por González-Córdova et al. (2010). Alícuotas de las leches fermentadas se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 12,000g durante 40 min, a 5°C con una centrífuga Beckman con rotor J2–21 (Fullerton, CA, EUA). El sobrenadante derivado de la centrifugación se filtró a través de fibra de vidrio y después por papel filtro Whatman No. 40. Posteriormente, el filtrado se ultrafiltró a través de membranas Macrosep Omega (Pall Co. Ann Arbor, MI, EUA) de <3 kDa a 16,000g durante 50 min a 5 8C. Las fracciones <3 kDa obtenidas se liofilizaron por medio de un Freeze Dry System marca LABCONCO (Kansas City, MO, EUA) y se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis.

### Preparación de las Muestras

La preparación de las muestras consistió en pesar 0.005 g de los extractos acuosos liofilizados de leches fermentadas por cada cepa específica de *L. lactis*, en el cual se encuentran fracciones de péptidos menores a 3 kDa, este material liofilizado fue aforado en un matraz de 5 mL con buffer de PBS con pH 7.4 (AOX Assay buffer) para obtener una concentración de 1 mg/mL. A esta concentración de muestra, se les realizó una dilución para obtener una concentración de 0.5 mg/mL para el posterior análisis de ambas concentraciones.

### Curva estándar de antioxidantes

Se preparó una curva estándar de Trolox (como antioxidante) con diluciones seriadas. Ésta consistió en agregar 80  $\mu\text{L}$  de AOX assay buffer a 16  $\mu\text{L}$  de 1.5 mM de solución de estándar de trolox para obtener una concentración final de 300  $\mu\text{M}$  de Trolox; posteriormente se realizaron diluciones seriadas para obtener concentraciones de 150  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ , 77.5  $\mu\text{M}$ , 18.75  $\mu\text{M}$ , 9.375  $\mu\text{M}$  hasta obtener una concentración final de 4.688  $\mu\text{M}$  de Trolox. Donde las alícuotas de los estándares de Trolox pueden ser utilizadas inmediatamente o almacenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 meses.

### Detección de la capacidad antioxidante mediante el método del ABTS

La detección del radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$ , se realizó mediante un lector de tipo ELISA (Opsys MR, VA, USA); en el ensayo se utilizó una placa estéril de 96 pocillos (Corning Incorporate., NY, USA).

Primeramente se hizo una dilución de la solución madre de mioglobina (100X) en un frasco ámbar, en donde se mezcló 25  $\mu\text{L}$  de esta solución con 2.475 mL de Agua ultrapura (MilliQ), para alcanzar una solución de trabajo (STMe) en una concentración final 1X, en donde esa cantidad de volumen está estimada para 100 muestras aproximadamente, sin embargo puede ser calculado para la cantidad de muestras a analizar.

Una vez que se obtuvo la solución de trabajo de la mioglobina, por cada pozo de la placa de ELISA se pusieron 10  $\mu\text{L}$  estándar de Trolox para cada concentración (300  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ , 77.5  $\mu\text{M}$ , 18.75  $\mu\text{M}$ , 9.375  $\mu\text{M}$ , 4.688  $\mu\text{M}$ ) y 20  $\mu\text{L}$  de solución de trabajo de mioglobina, de manera similar se puso la misma cantidad para las muestras (10  $\mu\text{L}$  + 20  $\mu\text{L}$  STMe) en cada pozo. Una vez adicionados por triplicado los estándares y muestras correspondientes a cada

pocillo se les adicionó 100  $\mu\text{L}$  de la Solución de ABTS; se agitó la placa manualmente a temperatura ambiente y se dejó incubar durante 5 minutos en la oscuridad para llevarse a cabo la formación del radical  $\text{ABTS}^{*\cdot}$ .

Una vez transcurrido los 5 minutos de incubación se le agregó 50  $\mu\text{L}$  solución de parado (1% de SDS) a cada pocillo de la placa, se dejó reposar 12 minutos a temperatura ambiente y se leyó la placa a una longitud de onda de 405 nm., un esquema general del procedimiento ensayo del ABTS se representa en la Figura 4. Se graficó la concentración de cada estándar de Trolox contra la absorbancia y a partir de la ecuación de la recta obtenida en la curva del antioxidante, se calculó la actividad antioxidante en las muestras, expresada como  $\mu\text{M}$  de equivalentes de Trolox (TEAC) bajo la siguiente expresión.

$$x = y - 0.8581 / -0.0012$$

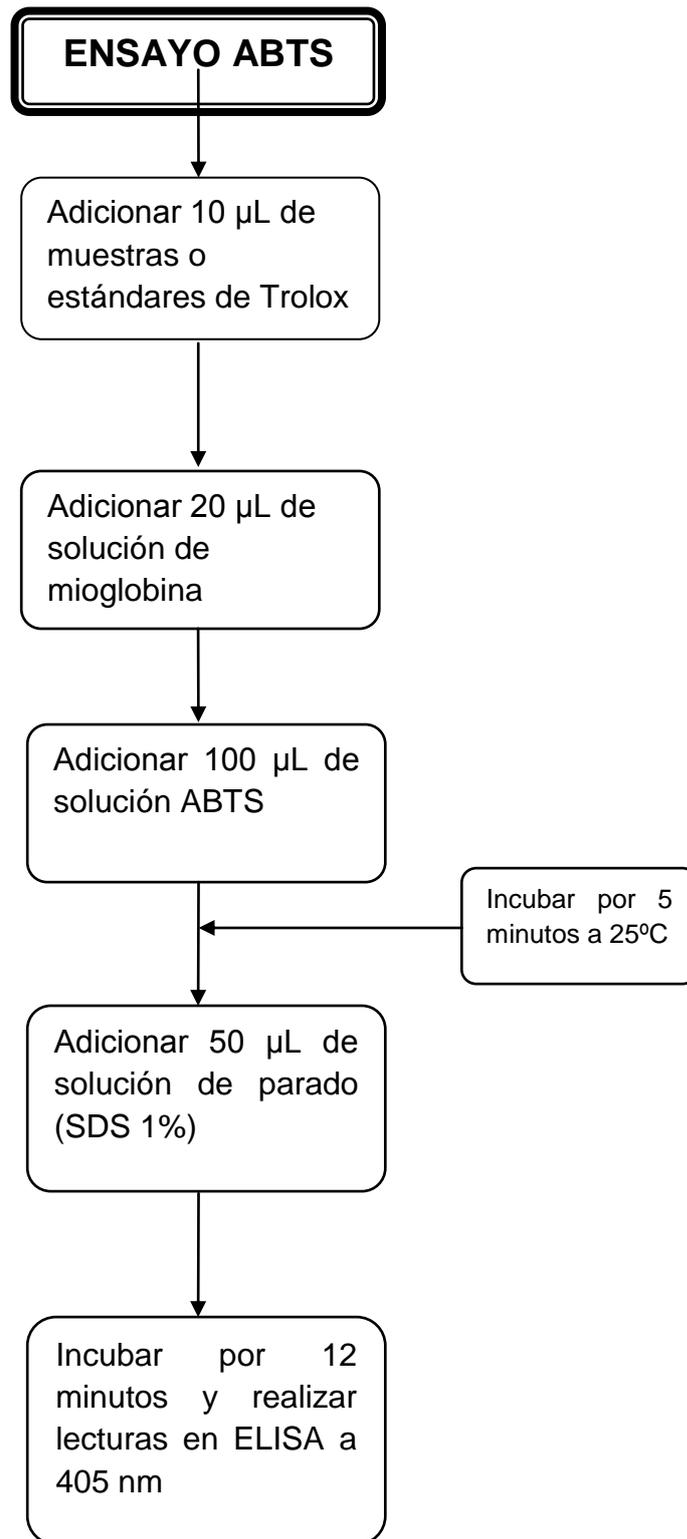
Donde (-0.0012) es la pendiente y 0.8581 es el intercepto en la recta.

El porcentaje de inhibición, el cual corresponde a la cantidad de radical  $\text{ABTS}^+$  neutralizado por el efecto del antioxidante fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_{405} \text{ blanco} - A_{405} \text{ muestra}}{A_{405} \text{ blanco}} \times 100$$

Donde  $A_{405}$  Blanco corresponde a la absorbancia inicial del  $\text{ABTS}^+$  (sin Trolox, solo buffer) y  $A_{405}$  muestra corresponde a la absorbancia de la muestra (Virtanen et al., 2007).

**Figura 4.** Ensayo del ABTS



El porcentaje de la actividad de antioxidante se realizó de acuerdo a Sadat et al. (2011) y se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Actividad} = \left[ \frac{1 - (A_r - A_b)}{(A_i - A_b)} \right] \times 100$$

Donde  $A_i$  corresponde a la absorbancia inicial del  $\text{ABTS}^+$ ,  $A_r$  es la absorbancia de la muestra y  $A_b$  es la absorbancia del buffer (AOX).

## VI. RESULTADOS Y DISCUSION

Se ha observado que algunas propiedades como la capacidad autolítica (rompimiento celular espontáneo), la capacidad proteolítica, capacidad antihipertensiva, capacidad antioxidante o algunas características como la producción de aromas o ciertos compuestos del sabor dependen del tipo de cepa y del nicho ecológico de aislamiento.

En este trabajo de investigación se evaluó la capacidad antioxidante de 20 extractos acuosos (EA) menores a 3 kDa obtenidos de leches fermentadas (LF) por medio de bacterias ácido lácticas (*L. lactis*) aisladas a partir de diferentes fuentes (Tabla 7). Dentro de las concentraciones evaluadas (1 mg y 0.5 mg) de EA, se observó actividad antioxidante en 16 extractos en ambas concentraciones, donde 18 y 16 de estos EA presentaron solo actividad a las concentraciones de 1 y 0.5 mg respectivamente; mientras que del total de los 20 EA solo dos no presentaron capacidad antioxidante en ninguna de las concentraciones evaluadas (Tabla 8).

Dentro de los 16 extractos acuosos de LF, las cepas que presentaron tener actividad antioxidante, fueron B7, J6, M1, M5 y M7 provenientes de origen vegetal, mientras que de origen lácteo fueron Q2, Q5 y R7 y por último Z1, P4, E1, E3, A1, K3, K5 y C1 de origen comercial.

Las cepas que presentaron mayor capacidad antioxidante fueron: K3, R7, B7 y M1 en una concentración de 1 mg, donde éstas fueron aisladas de origen comercial, lácteo y vegetal respectivamente; mientras que en la concentración de 0.5 mg fueron: R7, C1 y E3, provenientes de origen lácteo y comercial. En diversos estudios se ha observado que otras bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus*, *Leuconostoc* entre otras, también han demostrado tener actividad antioxidante (Virtanen et al., 2007; Gupta et al., 2009).

**Tabla 8.** Capacidad de la actividad antioxidante de *L. lactis* aisladas de diferentes fuentes

Cepa	1 mg	0.5 mg
B7 <sup>v</sup>	+	+
J6 <sup>v</sup>	+	+
M1 <sup>v</sup>	+	+
M5 <sup>v</sup>	+	+
M7 <sup>v</sup>	+	+
Q1 <sup>l</sup>	+	-
Q2 <sup>l</sup>	+	+
Q3 <sup>l</sup>	-	-
Q5 <sup>l</sup>	+	+
R1 <sup>l</sup>	+	-
R7 <sup>l</sup>	+	+
Z1 <sup>c</sup>	+	+
Z2 <sup>c</sup>	-	-
P4 <sup>c</sup>	+	+
E1 <sup>c</sup>	+	+
E3 <sup>c</sup>	+	+
A1 <sup>c</sup>	+	+
K3 <sup>c</sup>	+	+
K5 <sup>c</sup>	+	+
C1 <sup>c</sup>	+	+

(+) Presenta actividad antioxidante; (-) no presenta actividad antioxidante.

(<sup>v</sup>) origen vegetal, (<sup>l</sup>) origen lácteo, (<sup>c</sup>) origen comercial

### Actividad antioxidante expresada como equivalente de Trolox (TEAC)

El TEAC (por sus siglas en inglés) se define como la capacidad antioxidante expresadas como equivalentes ( $\mu\text{M}$ ) de Trolox, en el presente trabajo de investigación se construyó una curva estándar bajo diferentes concentraciones de Trolox, donde el valor de absorbancia para  $0 \mu\text{M}$  de Trolox fue de 0.870 y para el valor máximo de Trolox ( $300 \mu\text{M}$ ) fue de 0.500. El valor máximo en las desviaciones estándar fue de 0.0382 y mientras que el valor máximo del coeficiente de variación fue de 7.63. Los valores de absorbancias en las diferentes concentraciones de Trolox pueden observarse en la Tabla 9.

El comportamiento para las diferentes concentraciones de estándar de Trolox fue altamente lineal (Gráfica 1), donde la ecuación obtenida de la recta para la curva fue:  $y = 0.0012x + 0.8581$ , se obtuvo una  $R^2 = 0.9901$ , por lo cual se considera que la ecuación de la recta es válida para el cálculo de la capacidad antioxidante en las muestras; comparada con estudios previos de actividad antioxidante que han empleado bacterias ácido lácticas (Virtanen et al., 2007; Gupta et al., 2009).

### Capacidad antioxidante en leches fermentadas por bacterias ácido lácticas

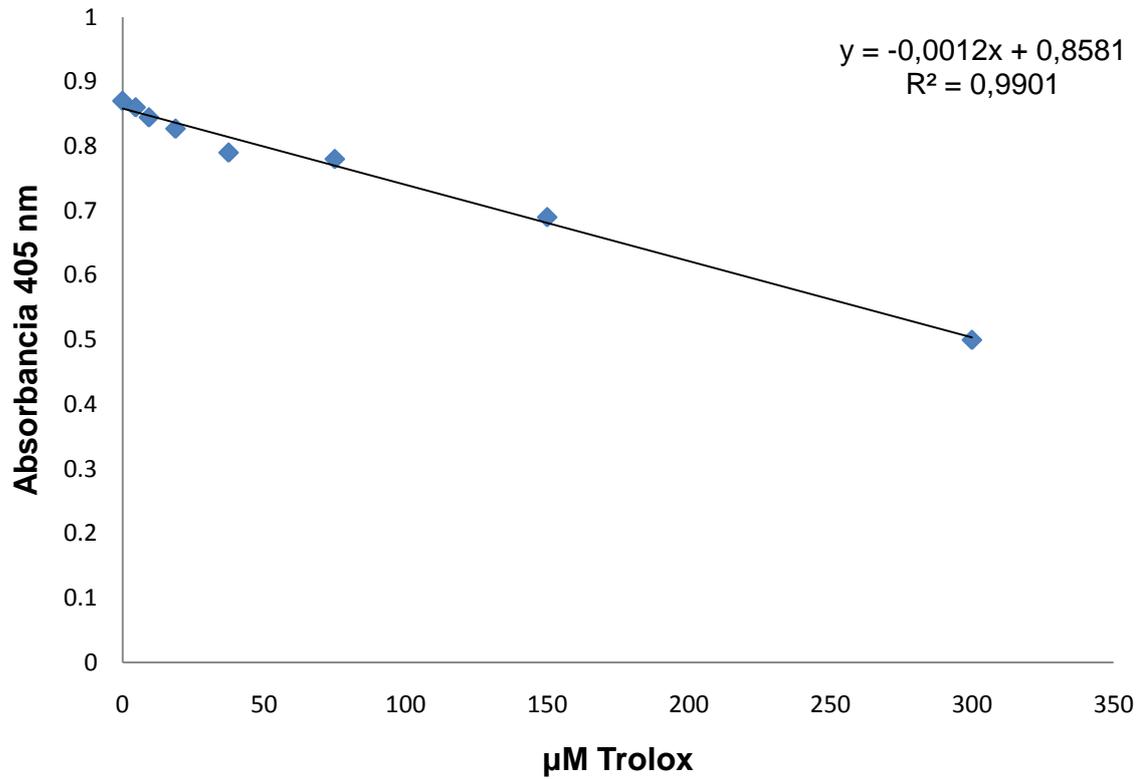
Una de las ventajas de la fermentación de leches por medio de bacterias ácido lácticas es la producción de péptidos con actividad biológica, tales como antihipertensiva, antioxidante, entre otras (Pihlanto, 2006).

**Tabla 9.** Concentraciones de Trolox

<b><math>\mu\text{M}</math> Trolox</b>	<b>Densidad óptica</b>
0	$0.870 \pm 0.001$
4,685	$0.860 \pm 0.014$
9,375	$0.845 \pm 0.004$
18,75	$0.827 \pm 0.004$
37,5	$0.790 \pm 0.008$
75	$0.780 \pm 0.028$
150	$0.690 \pm 0.028$
300	$0.500 \pm 0.038$

$\pm$  Desviación estándar

**Gráfica 1. Curva estándar de Trolox**



y = Densidad óptica observada  
x = Concentración de Trolox  $\mu\text{M}$

La actividad antioxidante se puede expresar de muchas maneras, una de las maneras es cuando se compara el valor de la muestra con respecto a un antioxidante natural o sintético (valor de referencia), en este trabajo se empleó el ensayo del ABTS, donde la capacidad antioxidante se expresa en la actividad de la muestra o compuesto a evaluar, en equivalentes de Trolox (TEAC), en porcentaje de inhibición del radical ABTS<sup>+</sup> y porcentaje de actividad antioxidante sobre el mismo radical.

Los valores de TEAC en las muestras fueron en un rango de 1.33-228.42  $\mu\text{M}$  de Trolox para las concentraciones de 1 y 0.5 mg evaluadas. En este trabajo, los rangos de concentración de TEAC para las muestras fermentadas con cepas *L. lactis* aisladas de origen vegetal fueron de 4.667-228.42  $\mu\text{M}$  de Trolox, mientras que las de origen lácteo presentaron valores de 1.33-166.75  $\mu\text{M}$  y por último las cepas comerciales presentaron 11.33-213.417  $\mu\text{M}$ , en ambas concentraciones evaluadas. Los valores individuales de la capacidad antioxidante en equivalente de Trolox para cada cepa como en cada concentración evaluada, pueden observarse en la Tabla 10.

Virtanen et al. (2007) encontró concentraciones con valores 160  $\mu\text{M}$  de Trolox en muestras de *L. lactis* ATCC 19435 (cepa de colección), estos valores concuerdan con las concentraciones encontradas en las leches fermentadas con cepas aisladas de origen lácteo en el presente estudio.

A pesar de que los valores de TEAC fueron bajos en algunos extractos, algunos extractos presentaron valores altos de TEAC, con respecto algunas fracciones peptídicas encontradas en extractos acuosos provenientes de leches fermentadas comerciales y leches UHT (Hernández-Ledesma et al., 2005). Por lo que esto indica que existe la presencia de fracciones peptídicas y/o producción de péptidos con actividad antioxidante; sin embargo que se sugiere se realicen mas estudios que involucren a la colección de fracciones peptídicas individuales, como el de estimar su secuencia de los péptidos (aminoácidos o

**Tabla 10.** Capacidad antioxidante de las cepas expresada en equivalentes de Trolox (TEAC)

Cepa	Concentración TEAC( $\mu$ M) A	Concentración TEAC( $\mu$ M) B
B7	138.00 $\pm$ 0.074	91.75 $\pm$ 0.068
J6	87.17 $\pm$ 0.077	10.08 $\pm$ 0.017
M1	228.42 $\pm$ 0.034	80.92 $\pm$ 0.059
M5	12.58 $\pm$ 0.024	4.667 $\pm$ 0.053
M7	74.67 $\pm$ 0.032	30.08 $\pm$ 0.011
Q1	50.92 $\pm$ 0.008	-
Q2	101.33 $\pm$ 0.047	42.17 $\pm$ 0.012
Q5	83.00 $\pm$ 0.052	33.83 $\pm$ 0.012
R1	1.33 $\pm$ 0.012	-
R7	166.75 $\pm$ 0.098	136.75 $\pm$ 0.017
Z1	31.75 $\pm$ 0.093	11.333 $\pm$ 0.043
P4	33.42 $\pm$ 0.016	99.67 $\pm$ 0.132
E1	82.17 $\pm$ 0.047	39.25 $\pm$ 0.055
E3	128.00 $\pm$ 0.054	213.42 $\pm$ 0.017
A1	76.75 $\pm$ 0.037	65.08 $\pm$ 0.027
K3	165.50 $\pm$ 0.084	78.00 $\pm$ 0.094
K5	108.83 $\pm$ 0.127	70.08 $\pm$ 0.068
C1	86.33 $\pm$ 0.080	147.17 $\pm$ 0.057

$\pm$  desviación estándar, TEAC=  $\mu$ M Trolox

A= 1mg de muestra, B=0.5 mg de muestra

residual de estos) ya que la secuencia, el tamaño o los aminoácidos residuales determinan el potencial antioxidante en los péptidos (Sadat et al., 2011).

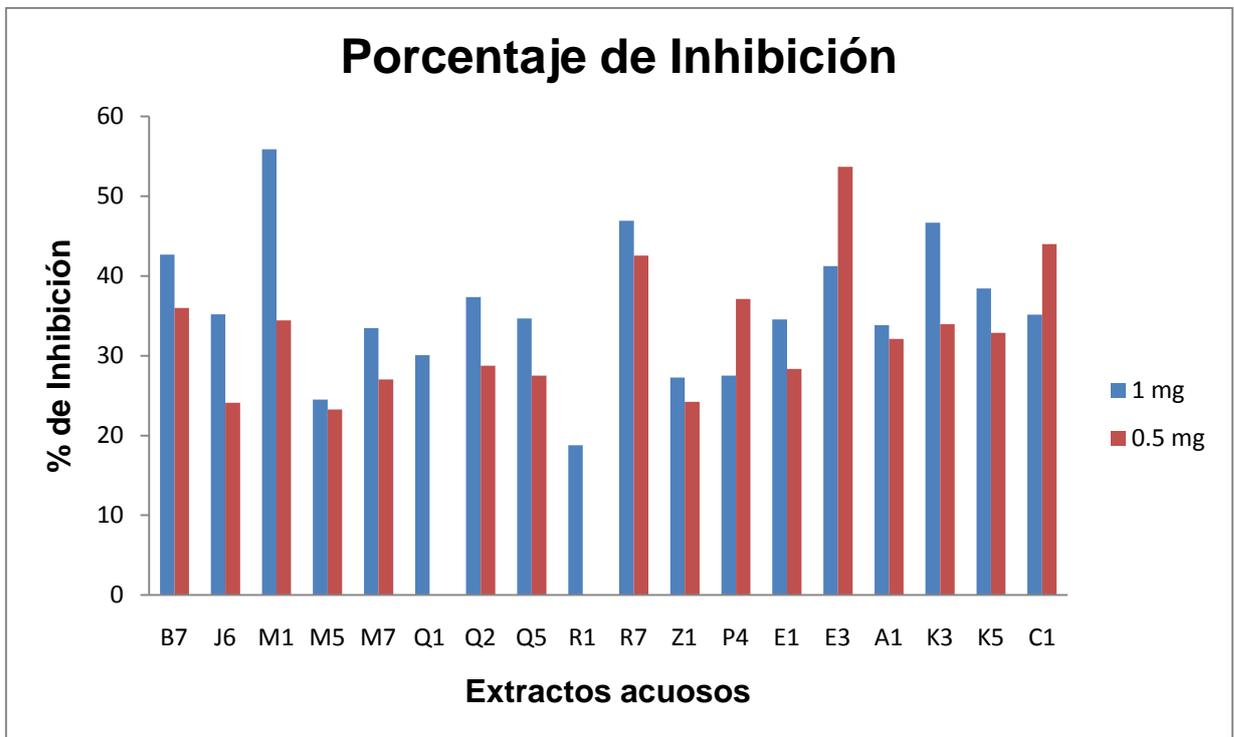
### Porcentaje de inhibición

El porcentaje de inhibición (Gráfica 2), el cual se refiere a la capacidad para neutralizar al radical ABTS<sup>+</sup> y con esto evitar o retardar las reacciones de oxidación, fue medido en todos los extractos acuosos de LF dividiéndose en tres grupos para ambas concentraciones evaluadas; en el primer grupo se encuentran aquellos que tuvieron bajo porcentaje de inhibición entre 1-10% (Gráfica 3), el segundo grupo consistió en aquellos que tuvieron un valor medio entre un 11-20% (Gráfica 4), mientras que el tercer grupo se considero a los que presentaron valores entre 21% o más (Gráfica 5).

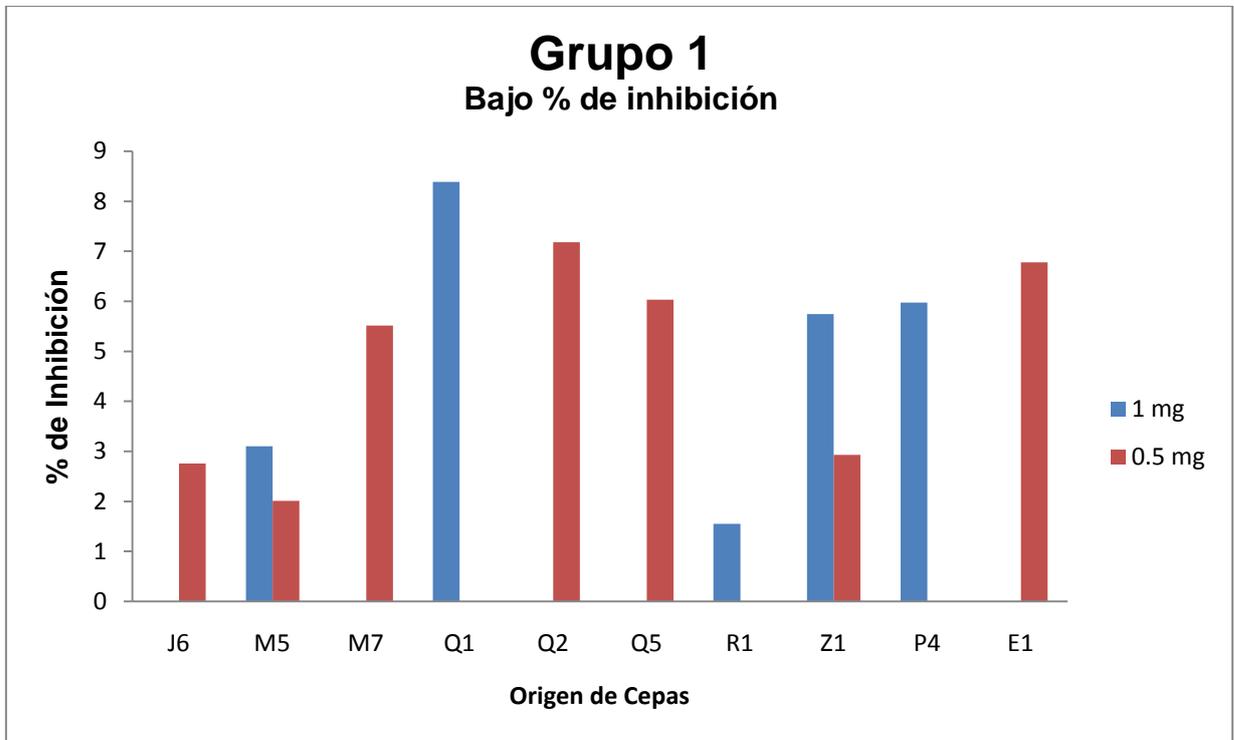
Virtanen et al. (2007) analizaron péptidos provenientes de leches fermentadas por varias bacterias ácido lácticas de colección. El mayor porcentaje de inhibición que obtuvieron fue de un rango de 20-30%. Algunas de estas bacterias fueron: *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus reuteri*, etc. Comparando dichos valores (rangos) con los de esta investigación, los EA que presentaron valores muy similares con respecto al estudio anterior son: B7, M1, K3 de origen vegetal y comercial para la concentración de 1 mg; C1 y E3 de origen comercial para la concentración de 0.5 mg; y el EA que tuvo alto porcentaje de inhibición en ambas concentraciones fue R7 de origen lácteo.

En investigaciones anteriores llevadas a cabo por Rodríguez-Figueroa et al. (2010), evaluaron los mismos EA que se estudiaron en este trabajo. En esa investigación los autores encontraron que todos los EA analizados presentaron capacidad antihipertensiva, es importante destacar que el EA R7 fue uno de los

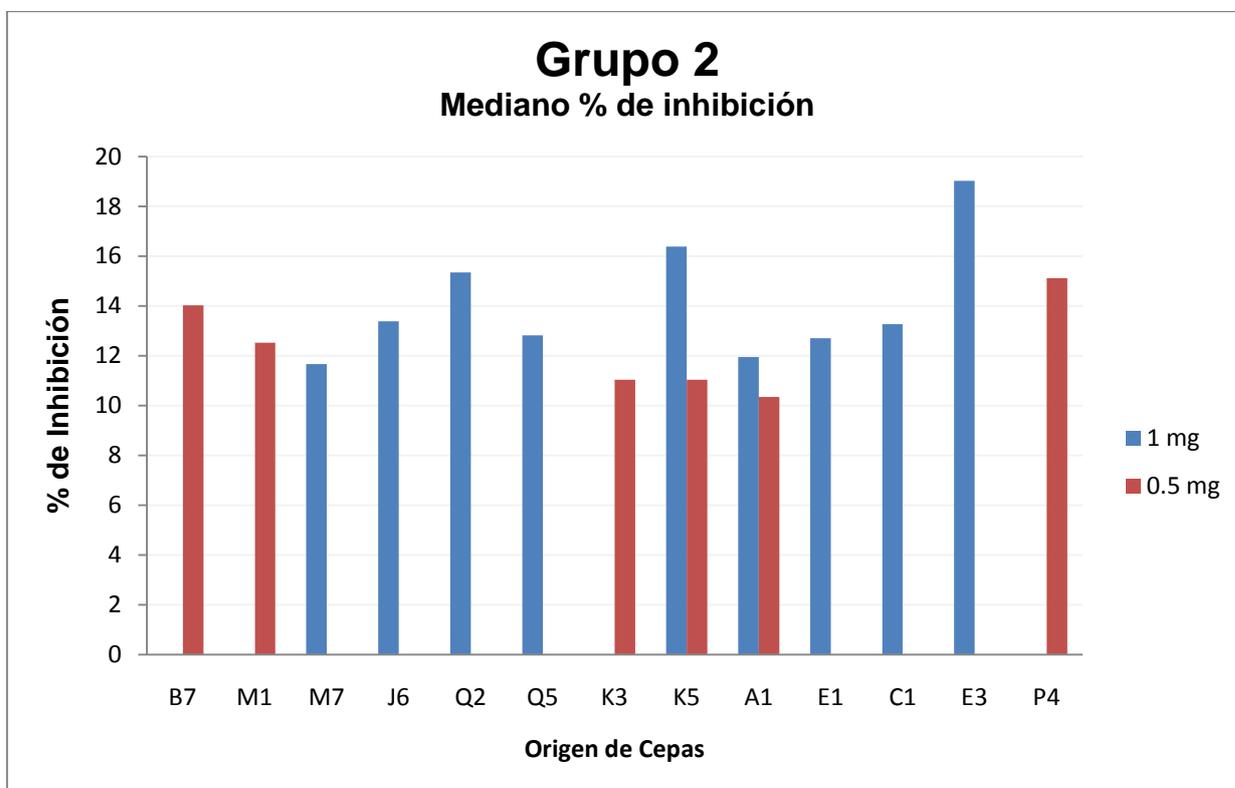
**Gráfica 2.** Porcentaje de inhibición de los EA



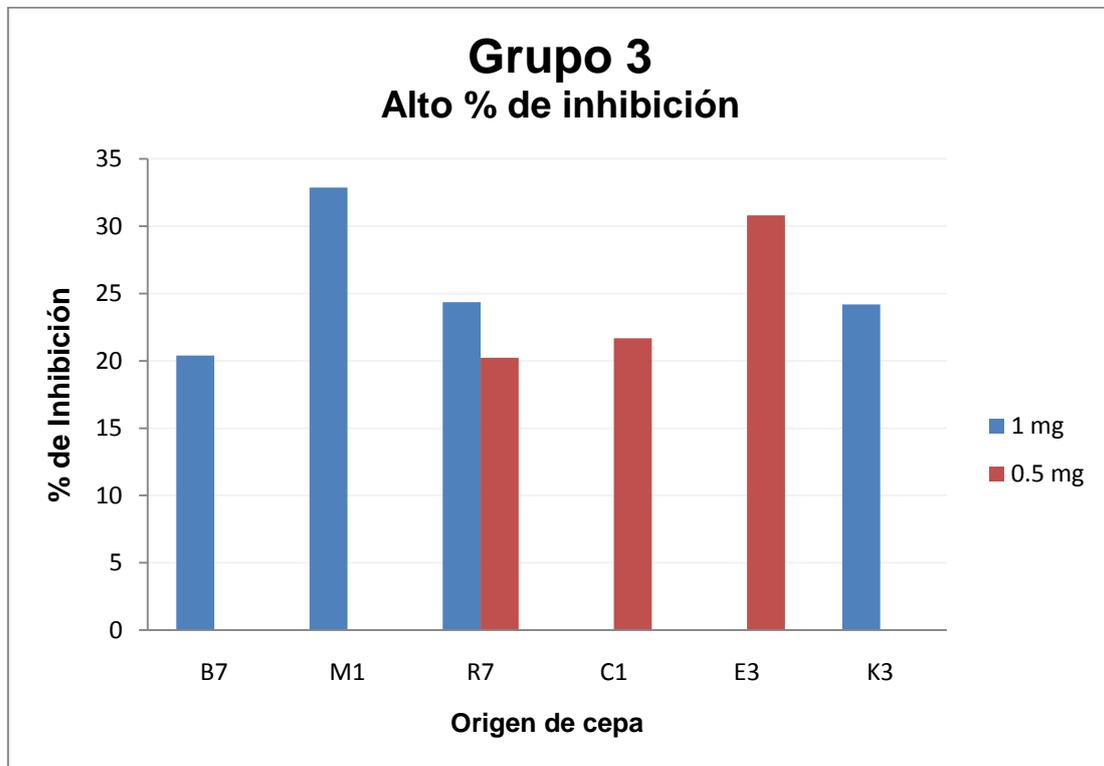
**Gráfica 3.** Porcentaje de inhibición del grupo 1 de los EA



**Gráfica 4.** Porcentaje de inhibición del grupo 2 de los EA



**Gráfica 5.** Porcentaje de inhibición del grupo 3 en EA



que presentó alta capacidad antihipertensiva o porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotenzina (IECA). Otro estudio realizado por Reyes (2010), analizó la capacidad de las cepas *L. lactis* (mismas del presente trabajo) para producir aroma en queso fresco; encontrando que la cepa R7 y B7 son las que tuvieron mayor auge en esta capacidad. Rivera (2010) estudió la capacidad autolítica de estas mismas cepas y coincide que la R7 es una de las cepas que presenta mayor capacidad de autólisis. En este estudio uno de los extractos acuosos que presentó mayor TEAC, porcentaje de inhibición y porcentaje de actividad antioxidante fue la R7.

Por lo que podría decirse que la cepa R7 tiene un alto potencial o capacidad de producir péptidos con actividad biológica con diferentes funciones en el organismo, o podría ser utilizada en ciertos procesos tecnológicos en los alimentos, que ayuden al desarrollo de nuevos alimentos con mejores características tales como la generación o potencialización de nuevos aromas o sabores

#### Porcentaje de actividad antioxidante

En lo que corresponde al porcentaje de actividad antioxidante todos los EA presentaron valores arriba del 18.8 % (Tabla 11) mientras que el mayor valor para dicho parámetro en la concentración de 1 mg fue M1 con un 55.88%, mientras que R1 fue el más bajo con un 18.8%; estos extractos fueron de origen lácteo y vegetal respectivamente. Para la concentración de 0.5 mg de EA el porcentaje de actividad más bajo fue de 23.27% en M5 y el más alto fue en E3 con 53.7% de actividad antioxidante. Otros autores han encontrado

**Tabla 11.** Porcentaje de actividad en los extractos acuosos

Cepa	1 mg % actividad antioxidante	0.5 mg % actividad antioxidante
B7	42.67	36.00
J6	35.20	24.12
M1	55.88	34.42
M5	24.48	23.27
M7	33.45	27.03
Q1	30.06	0
Q2	37.33	28.73
Q5	34.67	27.52
R1	18.8	0
R7	46.91	42.55
Z1	27.27	24.24
P4	27.52	37.09
E1	34.55	28.36
E3	41.21	53.70
A1	33.82	32.12
K3	46.66	33.94
K5	38.42	32.85
C1	35.15	44.00

porcentajes de inhibición en fracciones peptídicas de  $\alpha$ -lactoalbumina entre 31 y 85% (Sadat et al., 2011).

Los extractos acuosos de LF evaluados en este estudio, presentaron tener la habilidad de protón-donante, los cuales podrían servir como inhibidores de radicales libres, realizando funciones como antioxidantes; esto quizás se deba a que estos extractos contienen fracciones peptídicas menores a 3 kDa de cadena corta, dentro de las cuales podrían presentar aminoácidos aromáticos, o algunos residuos de aminoácidos (triptófano) que potencialicen la capacidad antioxidante, ya que son los postulados para que algún péptido presente indicios de actividad a antioxidante (Sadat et al., 2010). Por lo anterior se recomienda otros estudios para la identificación de la secuencia de los péptidos en los extractos acuosos estudiados, para continuar su evaluación de la capacidad antioxidante total.

Sin embargo es importante destacar que este es el primer estudio enfocado a evaluar y detectar si existe alguna evidencia de que leches fermentadas con *L. lactis* aisladas de fuentes vegetales y de productos lácteos presenten actividad o capacidad antioxidante, para que en un futuro estas cepas puedan ser consideradas en cultivos iniciadores para desarrollar nuevos alimentos funcionales

## VII. CONCLUSIONES

- Se establecieron las condiciones para determinar la capacidad antioxidante mediante el ensayo del ABTS para extractos acuosos provenientes de leches fermentadas.
- Se detectó la actividad antioxidante (TEAC) en 18 extractos acuosos, mientras que en 2 extractos no presentaron actividad antioxidante.
- Se encontraron rangos de TEAC entre 1.33-228  $\mu\text{M}$  en todos los extractos acuosos menores a 3 kDa.
- Se obtuvieron porcentajes de inhibición mayor a 30 y el mayor porcentaje de actividad antioxidante fue de 55.
- El extracto acuoso R7 presentó valores altos para TEAC, porcentaje de inhibición y porcentaje de actividad antioxidante; en las concentraciones de 1 y 0.5 mg.

## VIII. LITERATURA CITADA

Alvarado, C., and M. Guerra. 2010. Lactosuero como fuente de peptidos bioactivos. *Anales Venezolanos de Nutrición*. 23(1):42-49.

Antolovich, M., P.D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, and K. Robards. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 127:183-198.

Arihara, K. 2004. Functional foods. In *Encyclopedia of Meat Sciences*. Jensen, W.; Devine, C. & Dikemann, M. (Eds.). 1:492-499. London, UK: Elsevier Science Ltd.

Arnao, M.B. 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science and Technology*. 11:419-421.

Baró, L., J. Jiménez, A. Martínez-Férez, and J.J. Bouza. 2001. Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *Ars. Pharmaceutica*. 42(3-4):135-145.

Batish VK, H. Chander, K.C. Zumdegeni, K.L. Bhatia, and R.S. Singh. 1988. Antibacterial activity of lactoferrin against some common food-borne pathogenic organisms. *Aust. J. Dairy Technol*. 5:16-18.

Bayram T, M. Pekmez, N. Arda, and A. Yalcin. 2008. Antioxidant activity of whey protein fractions isolated by gel exclusion chromatography and protease treatment. *Talanta*. 75: 705-9.

Bogsted, A.K., K. Johansen, R. Hatta, M. Kim, M. Casswall, L. Svensson, and L. Hammerstrom. 1996. Passive immunity against diarrhea. *Acta Paediatrica*. 85:125-128.

Bostwick, E.F., J. Steijns, and S. Braun. 2000. Lactoglobulins. Natural food antimicrobial systems. 133-158.

Bourne, L.C., and C.A. Rice-Evans. 1999. Detecting and measuring bioavailability of phenolics and flavonoids in humans: pharmacokinetics of urinary excretion of dietary ferulic acid. *Method. Enzimol*. 299:91-106.

Brody, E.P. 2000. Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British J. Nutr*. 84:39-46.

Calvo, M. (2006) Interaction of bovine alpha-lactalbumin with fatty acids as determined by partition equilibrium and fluorescence spectroscopy. *International Dairy Journal* 16(1): 18-25.

Carbajal, A., F. Pérez, S. Zamora, and F.J. Sánchez. 2005. Alimentación y salud. Conceptos actuales de dieta prudente. La alimentación en el adulto. Sociedad Española de Nutrición. In press.

Chen, H.M., K. Muramoto, F. Yamauchi, K. Fujimoto, and K. Nokihara. 1998. Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein. *J. Agr. Food Chem.* 46:49-53.

Clare, D.A., and H.E. Swaisgood. 2000. Bioactive milk peptides: A prospectus. *J. Dairy Sci.* 83:1187–1195.

Cumby, N.; Y. Zhong, M. Naczki, and F. Shahidi. 2008. Antioxidant activity and waterholding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chem.* 109(1):144-148.

Daniel, H., M. Vohwinkel, and G. Rehner. 1990. Effect of casein and  $\beta$ -casomorphin on gastrointestinal motility in rats. *J. Nutr.* 120:252-257.

Diplock, A.T., P.J. Aggett, M. Ashwell, F. Bornet, E.B. Fern, and M.B. Roberfroid. 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *Brit. J. Nutr.* 81(51):51-70.

Ebringer, L., M. Ferencik, and J. Krajcovic. 2008. Beneficial health effects of milk and fermented dairy products. Review. *Folia Microbiol.* 53(5):378-394).

Erdmann K., B. Cheung, and H. Schroder. 2008. The possible roles of food derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *J. Nutr. Biochem.* 19:643-54.

Gobbetti, M., L. Stepaniak, M. De Angelis, A. Corsetti, and R. Di Cagno. 2002. Latent Bioactive Peptides in Milk Proteins: Proteolytic Activation and Significance in Dairy Processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42:223-239.

González-Córdova, A. F., M.J. Torres-Llanez, J. Rodríguez-Figueroa, J.J. Espinoza-De-Los-Monteros, H.S. García, and B. Vallejo-Cordoba. 2010. Actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina en leches fermentadas con cepas de *Lactobacillus*. *CYTA Journal of Food. En Prensa.*

Gupta, A., B. Mann, R. Kumar, and R.B. Sangwan. 2009. Antioxidant activity of cheddar cheese at different stages of ripening. *Int. J. Dairy Technol.* 62(3):339-347.

Gutiérrez-Méndez, N., B. Vallejo-Córdova, A.F. González-Córdova, G.V. Nevárez-Moorillón, and B. Rivera-Chavira. 2008. Evaluation of Aroma

Generation of *Lactococcus lactis* with an Electronic Nose and Sensory Analysis. J. Dairy Sci. 91:49-57.

Hajirostamloo, B. 2010. Bioactive Component in Milk and Dairy Product. Engineering and Technology. 72:162-167.

Haque, E., and R. Chand. 2006. Milk protein derived bioactive peptides. [Online] UK: Available: <http://www.dairyscience.info/bio-peptides.htm>. Accessed: 25 April 2009.

Hayes, M., C. Stanton, G. Fitzgerald, and R.P. Ross. 2007. Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: Bioactive peptide functions. Biotechnol. J. 2:435-449.

Hernández-Ledesma, B., B. Miralles, L. Amigo, M. Ramos, and I. Recio. 2005. Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. J. Sci Food Agric. 85:1041-1048.

Holt, C., and D.S. Horne. 1996. The hairy casein micelle: Evolution of the concept and its implications for dairy technology. Netherlands Milk & Dairy Journal. 50: 85-112.

Huang, D., B. Ou, B., and R.L. Prior. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agr. Food Chem. 53(6):1841- 1856.

ILSI-Europe. Concepts of Functional Foods.

<http://europe.ilsa.org/publications/Monographs/ConceptsofFunctionalFoods.htm>

Issa, A.Y., S.R. Volate, and M.J. Wargovich. 2006. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. J. Food Compos. Anal. 19(5):405-419.

Je, J.Y., P.J. Park, and S.K. Kim. 2005. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. Food Res. Int. v. 38, n. 1, p. 45-50.

Jiménez Colmenero, F. 2006. Meat based functional foods. In Hui, Y. H. (Eds.). Handbook of Food Products Manufacturing. John Wiley. In press.

Jollès, P., M.H. Loucheux-Lefebvre, and A. Hanschen. 1978. Structural relatedness of  $\kappa$ -casein and fibrinogen  $\gamma$ -chain. J. Mol. Evol., 11:271.

- Kim, S.K., H.G. Byun, P.J. Park, and F. Shahidi. 2001. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 49(6):2992-2997.
- Kitts, D.D., and K. Weiler. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr. Pharma. Design.* 9(16):1309-1323.
- Korhonen, H., and A. Pihlanto. 2003. Food-derived bioactive peptides - opportunities for designing future foods. *Curr. Pharma. Design.* 9:1297-1308.
- Korhonen, H., and A. Pihlanto. 2004. Milk-derived bioactive peptides: formation and prospects for health promotion in Handbook of functional dairy products. *Functional foods and nutraceuticals.* 109-124.
- Korhonen, H., and A. Pihlanto. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.* 16:945-960.
- Leroy, F., and L. De Vyust. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Tech.* 15:67-78.
- Lobo, V., A. Patil, A. Phatak, and N. Chandra. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* 4(8):118-126.
- Lorenzo, H.C., B. Rodríguez, E.M. Rodríguez and C. Díaz. 2009. Antioxidant capacity of different onion cultivars. *J. Food.* 7(1):53-38.
- Loukas, L., D. Varoucha, C. Zioudron, R.A. Straty, and W.A. Klee. 1983. Opioid activities and structures of alpha-casein-derived exorphins. *Biochemistry-US.* 22:4567-4573.
- Matill, H.A. 1947. Antioxidants. *Annu. Rev. Biochem.* 16:177-192.
- Mburu, S., S. Chelulei, W. Chen, X.M. Ming, and R.R. Lu. 2010. Alpha-lactoalbumin: Its production technologies and bioactive peptides. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 9:197-212.
- Meisel, H., and R.J. FitzGerald. 2003. Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr. Pharma. Design.* 9:1289-1295.
- Mendis, E., N. Rajapakse, and S.K. Kim. 2005. Antioxidant properties of a radicalscavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *J. Agr. Food Chem. Chicago.* 53(3): 581-587.
- Migliore-Samour, D., F. Floch, and P. Jolles. 1989. Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation. *J. Dairy Res.* 56:357.

Miller, N.J., and C.A. Rice-Evans. 1996. Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Report*. 2(3):161-171.

Naito H., A. Kawakami, and T. Imamura. 1972. In vivo formation of phosphopeptide with calcium-binding property in the small intestinal tract of the rat fed on casein. *Agr. Biol. Chem. Tokyo*. 36:409-415.

Nawar, W.W. 1996. Lipides. In *Food Chemistry*. Fennema, O.R. (ed) 3<sup>ra</sup> Edición. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York. 780-781.

Nomura, M., M. Kobayashi, T. Narita, H. Kimoto-Nira, and T. Okamoto. 2006. Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. *J. Appl. Microbiol.* 101:396-405.

Olaiz-Fernández G., J. Rivera-Dommarco, T. Shamah-Levy, R. Rojas, S. Villalpando-Hernández, M. Hernández-Avila, and J. Sepúlveda-Amor. 2006. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Instituto Nacional de Salud Pública

Organización Mundial de la Salud. (OMS). 2003. Diet, Nutrition and Prevention of chronic diseases. WHO Technical report Series 916.

Pascal, G. 1996. Functional foods in the European Union. *Nutr. Rev.* 54:11(II):S29-S32

Payne K.D., P.M. Davidson, and S.P. Oliver. 1990. Influence of bovine lactoferrin on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* 53:468-472.

Peng X., Y. Xiong, and B. Kong. 2009. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. *Food. Chem.* 113: 196-201

Peña-Ramos, E.A., Y.L. Xionga, and G.E. Arteaga. 2004. Fractionation and characterization for antioxidant activity of hydrolyzed whey protein. *J. Sci. Food Agric.* 84(14):1908-1918.

Pihlanto, A., and H. Korhonen. 2003. Bioactive peptides and proteins. In *Advances in Food and Nutrition Research*, edited by S.L. Taylor. Elsevier Inc. San Diego, CA. pp. 175-276

Pihlanto, A. 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Int. Dairy J.* 16: 1306-1314.

Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C.A. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decoloration assay. *Free Radical Bio. Med.* 26(9): 1231-1237.

Reyes, R. 2010. Determinación de compuestos volátiles responsables del aroma del queso fresco producidos por cepas de *Lactococcus lactis*. Tesis de maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

Ribeiro, S.M.R. 2005. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience J.* 21:133-149.

Rivera, E. 2010. Evaluación de la actividad autolítica producida por cepas de *Lactococcus lactis* aisladas de diversos nichos ecológicos. Tesis de licenciatura en Químico-Biólogo. Universidad de Sonora.

Robert P.R., and G.P. Zaloga. 1994. Dietary bioactive peptides. *Geoth. Res. T.* 2:237-243.

Rodríguez-Figueroa, J.C., R. Reyes-Díaz, A.F. González-Córdova, R. Troncoso-Rojas, I. Vargas-Arispuro, and B. Vallejo-Cordoba. 2010. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk fermented by wild and industrial *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Science.* 93(11). *En Prensa.*

Rover Junior, L. 2001. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quím. Nova.* 24(1):112-119.

Sadat, L., C. Cakir-Kiefer, M.A. N'Negue, J.C. Gaillard, J.M. Girardet, and L. Miclo. 2011. Isolation and identification of antioxidant peptides from bovine  $\alpha$ -lactoalbumin. *Int. Dairy J.* 21:214-221.

Saito H., H. Miyakawa, Y. Tamura, S. Shimamura, and M. Tomita. 1991. Potent bacteriocidal activity of bovine lactoferrin hydrolysate reproduced by heat treatment at acidic pH. *J. Dairy Sci.* 74:3724-3730.

Sakanaka, S., Y. Tachibana, N. Ishihara, and L.R. Juneja. 2004. Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in linoleic acid oxidation system. *Food Chem.* 86(1):99-103.

Schlimme E., and H. Meisel. 1995. Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. *Die Nahrung*. 39:1-29.

Segura-Campos, M., L. Chel-Guerrero, and D. Betancur-Ancona. 2010. Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. *Rev. Chil. Nutr.* 37:386-391.

Séverin, S., and X. Wenshui. 2005. Milk biologically active components as nutraceuticals: Review. *Critical Reviews in Food and Science Nutrition*. 45:645-656.

Shah, N. P. 2000. Effects of milk-derived bioactives: an overview. *Brit. J. Nutr.* 84:S3-S10.

Silva, E., and I. Verdalet. 2003. Revisión: alimentos e ingredientes funcionales derivados de la leche. *Arch. Latinoam. Nutr.* 53(4):333-347.

Sloan, A. E. 1999. Top ten trends to watch and work on for the millenium. *Food Technol.* 53(8):40-60.

Steijns, J.M. 2001. Milk ingredients as nutraceuticals. *Int. J. Dairy Technol.* 54:81-88.

Suetsuna, K., H. Ukeda, and H. Ochi. 2000. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *J. Nutr. Biochem.* 11(3):128-130.

Sybesma, W., J. Hugenholtz, W. M. de Vos, and E. Smid. 2006. Safe use of genetically modified lactic acid bacteria in food. Bridging the gap between consumers, green groups and industry. *Electron. J. Biotechno.* 9(4):424-448.

Thaipong, K., U. Boonprakob, K. Crosby, L. Cisneros-Zevallos, and D.H. Burne. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays forestimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* 19:669-675.

Torres-Llenez, M.J., B. Vallejo-Cordoba, and A.F. González-Córdova. 2005. Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche. *Arch. Latinoam. Nutr.* 55:111.

Yamamoto, N. 1997. Antihypertensive peptides derived from food protein. *Biopolymers*. 43:129-43.

Van der Ven, C. 2002. Biochemical and functional characterization of casein and whey protein hydrolysates. A study on the correlations between biochemical and functional properties using multivariate data analysis. Ph.D thesis, Wageningen University, The Netherlands

Vermeirssen, V., J. Van Camp, and W. Verstraete. 2004. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Brit. J. Nutr.* 92:357–366.

Vinderola C.G., W. Prosello, and J.A. Reinheimer. 2000. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and Nonprobiotic Microflora in Argentinian Fresco Cheese. *J. Dairy Sci.* 83:1905-1911.

Vioque, J., J. Pedroche, M. Yust, H. Lqari, C. Megías, J. Girón-Calle, M. Alaiz, and F. Millán. 2006. Bioactive peptides in storage plant proteínas. *Braz. J. Food Technol.* 99-102.

Virtanen, T., A. Pihlanto, S. Akkanen, and H. Korhonen. 2007. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 102:106-115.

Wang, L.L., and Y.L. Xiong. 2005. Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolysed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability. *J. Agric. Food Chem.* 53(23):9186-9192.

Wang, J.S., M.M. Zhao, Q.Z. Zhao, and Y.M. Jiang. 2006. Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. *Food Chem.* 101(4):1658-1663.

Weiner, C., Q. Pan, M. Hurtif, T. Boren, E. Bostwick, and L. Hammerstrom. 1999. Passive immunity against human pathogens usine bovine antibodies. *Clinical Experimental Immunology.* 116:193-205.