

**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**“ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE *Lactococcus lactis*
RELACIONADAS CON LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA
CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA EN LECHE
FERMENTADAS”**

POR:

JESÚS FRANCISCO MONZÓN BENSOJO

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
DE ORIGEN ANIMAL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

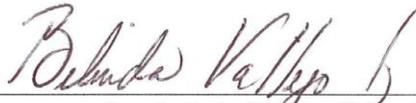
MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

DICIEMBRE DE 2012

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Jesús Francisco Monzón Bensojo, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de maestría en ciencias



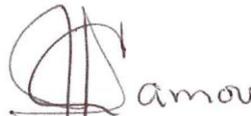
Dra. Belinda Vallejo Galland
Director de Tesis



Dr. Aarón Fernando González Córdova
Asesor



Dr. Adrián Hernández Mendoza
Asesor



Dr. Juan Pedro Camou Arriola
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González

Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACYT por la beca que me otorgó. La beca me permitió cursar la Maestría en Ciencias. Sin ella, me habría sido imposible financiar mis estudios.

Agradezco al CIAD y a todo su personal por todos y cada uno de los servicios que recibí. Agradezco la formación que recibí de parte de los investigadores-docentes: Dr. Aarón Fernando González Córdova, Dr. Miguel Ángel Mazorra Manzano, Dr. Miguel Manríquez Durán, Dr. Humberto González Ríos, Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez, Dra. Etna Aída Peña Ramos, Dr. Fernando Ayala Zavala, Dr. Alberto González León, Dra. Graciela Caire Juvera, Dr. Tomás Madera Santana, Dra. Yolanda Leticia López Franco, Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro y Dra. Gloria Yépiz Plascencia.

Agradezco a la Dra. Belinda Vallejo Galland el que me abriera la puerta del área de lácteos, el recibir de su parte la oportunidad de seguir estudiando y que estuviera conmigo en los momentos más decisivos de la maestría. Agradezco al Dr. Aarón Fernando González Córdova el que dejara permanentemente abierta la puerta de su oficina, el que estuviera pendiente de que no me hiciese falta ningún recurso y el que me recibiera siempre de una manera amable y fraternal. Agradezco al Dr. Adrián Hernández Mendoza el que estuviera pendiente de mí aún estando en Portugal, el que contribuyera a mi formación a través de la institución del seminario del área de lácteos y el que haya sido un padre académico durante mi presentación oral en el seminario de investigación II del cuarto semestre. Al Dr. Juan Pedro Camou Arriola agradezco el aceptar ser miembro de mi comité de tesis, su tolerancia y su paciencia. Agradezco al Dr. Miguel Ángel Mazorra Manzano su preocupación genuina por mi formación, por las segundas e incluso terceras oportunidades que recibí de él, por conseguir que me volviera a interesar en la ciencia y por su cariño académico. Agradezco a la Dra. María de Jesús Torres Llenez el haberme facilitado el acceso a los equipos del laboratorio bajo su cargo y por proporcionarme las cepas con las que trabajé. Agradezco a la MC María del Carmen Estrada Montoya el haberme facilitado el acceso a los equipos de los laboratorios bajo su cargo y por preocuparse por la solicitud, recepción,

almacenamiento y entrega de los materiales que usé. Agradezco al MC Ricardo Reyes Díaz el que haya corregido el contenido y el formato de mi tesis hasta la obtención de la versión definitiva.

Gracias a mis compañeros de generación y de área por hacer que volviera a creer en las personas. Gracias: Gonzalo Santos López, Damián López Peña, Roberto Rodríguez Ramírez, José Carlos Rodríguez Figueroa, Jesús Sosa Castañeda, Priscilia Heredia Castro, Aline Reyes Díaz, Carlos Gabriel González Becuar, Vanessa Saracho Álvarez, Sarahí del Carmen Rangel Ortega, Montserrat Vargas Negrete, Lourdes Santiago López, Lilia María Beltrán Barrientos, Samantha Gricel Loaiza Anaya, Olga Lidia Ramírez Valdez, María de los Ángeles de la Rosa Alcaraz, Ángel Martín Ortiz Estrada, Jesús Martín Moreno Hernández, José Isidro Méndez Romero, Fausto Cantú Cornelio, Geovanni Arguello Alfaro, José Miguel Serrano Solís, José Eleazar Aguilar Toalá, Alejandro Santos Espinosa, Trinidad López Armenta, Christian Gómez Pineda, Elvia Guadalupe Medina Contreras, Elena Corzo Cobos, María de los Ángeles Aguilera Avendaña, Rocío Hernández Mendoza, Rogelio Salazar Enciso, Cristóbal Hernández Toledo, Yair Antonio Paco Ramírez, Marisol Luna Martínez, Juan Francisco Castro Quiñonez, Paul Fernando Cuevas González, Jaime Rivera Rodríguez, Ittai Esquer Rodríguez, Lucio Benítez Romero, Ariatne Monzerrat de Paz Ramos, Rubí Cruz Ramos, José Daniel Wicochea Rodríguez.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios. Estoy seguro de su existencia y amor. Es el único que queda cuando me estoy portando peor. Lo hace por una simple y sencilla razón, sabe que es cuando más lo necesito. Gracias por los dones de la vida, la salud y la libertad.

Dedico esta tesis a: Mis padres: Francisco Monzón Chávez (q.e.p.d.) y Rosa María Bensojo Rico. A mis hermanos: Luis René Monzón Bensojo y Pablo Monzón Bensojo. A mis cuñadas: Claudia Verónica Ponce Lara y María Araceli Bedoy Quiñones. A mis sobrinas: Claudia Angélica Monzón Ponce, María Araceli Monzón Bedoy, Patricia Verónica Monzón Ponce y a mi sobrino Pablo Monzón Bedoy.

Dedico esta tesis a mi tío Francisco Oscar Bensojo Rico y a toda su familia, porque han sido fuente de inspiración y fraternidad tanto conmigo como con el resto de mi familia.

CONTENIDO

	Página
Lista de Figuras	x
Lista de Tablas	xi
Resumen	xiii
Abstract	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1. Bacterias Ácido Lácticas	4
2.2. Fermentación de la Leche	5
2.3. <i>Lactococcus lactis</i>	8
2.3.1. Hábitats	8
2.3.2. Auxotrofia	9
2.3.3. Metabolismo de lactosa	9
2.3.4. Metabolismo de ácido cítrico	9
2.3.5. Diseño de cultivos iniciadores apropiados	10
2.3.6. Cepas nativas	11
2.4. Las Proteínas de la Leche	13
2.5. El Sistema Proteolítico de <i>Lactococcus lactis</i>	14
2.5.1. La proteasa de <i>Lactococcus lactis</i>	15
2.5.1.1. Estructura de proteasa	16
2.5.1.2. Especificidad de proteasa	17
2.5.2. Mecanismos de transporte de péptidos	17
2.5.3. Las once peptidasas intracelulares	18

CONTENIDO (Continuación)

	Página
2.6. Péptidos antihipertensivos.....	24
2.6.1. Evaluación <i>in vitro</i> de inhibición de ECA	24
2.6.2. Relación estructura función de péptidos antihipertensivos.....	25
2.7. Actividad Peptidasa de <i>Lactococcus lactis</i> en leche	28
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	32
III. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. Sustratos, Reactivos y Materiales	33
3.2. Cepas de <i>Lactococcus lactis</i>	34
3.3. Reactivación y Propagación de Cepas en Caldo M17	34
3.4. Preparación, Inoculación y Fermentación de Leches.....	34
3.5. Obtención de sobrenadante, suspensión celular y contenido intracelular.....	35
3.5.1. Obtención de sobrenadantes de leches fermentadas	35
3.5.2. Obtención de la suspensión de células íntegras de las cepas bajo estudio.....	35
3.5.3. Obtención de contenido intracelular de las cepas bajo estudio.....	36
3.6. Medición de Actividad Proteasa en Células Íntegras.....	36
3.7. Medición de Actividad Peptidasa de Contenido Intracelular.....	37
3.8. Medición de Actividad Peptidasa en Sobrenadante de Leche Fermentada	38
3.9. Curvas de Calibración de Para-Nitroanilina	38
3.10. Obtención del Conjunto de Péptidos Menor de 3 kDa.....	38
3.11. Medición del %AIECA	39
3.12. Cuantificación de Proteína	40
3.13. Determinación de IC ₅₀	40

3.14. Análisis Estadístico	41
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
V. CONCLUSIONES	55
VI. BIBLIOGRAFÍA	56

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. pH de leche fermentada por cepas de <i>L. lactis</i> durante 12 h	42
Figura 2. Capacidad acidificante de cepas de <i>L. lactis</i> que fermentaron leche durante 12 h.....	43
Figura 3. Valores de IC ₅₀ (barras) y %AIECA (rombos) del extracto acuoso < 3 kDa obtenido de las leches fermentadas con cepas de <i>L. lactis</i> durante 12 h.....	45

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Microorganismos usados en la producción de leches fermentadas específicas.....	7
Tabla 2. Distribución de proteínas en la leche	14
Tabla 3. Distribución de aminoácidos en proteínas de la leche de ganado vacuno occidental	15
Tabla 4. Proporción de aminoácidos en proteínas de leche	16
Tabla 5. Peptidasas de BAL caracterizadas genéticamente	20
Tabla 6. Estudios con humanos de disminución de presión arterial por ingesta de productos lácteos y péptidos de la leche	27
Tabla 7. Mezclas de reacción para la determinación de actividades peptidasa.....	37
Tabla 8. Mezclas de reacción para determinar el %AIECA	39
Tabla 9. Valores de IC ₅₀ y %AIECA del extracto acuoso < 3 kDa de leches fermentadas con cepas de <i>L. lactis</i> (< 12 h)	45
Tabla 10. Valores de actividad proteasa y peptidasa de cepas de <i>L. lactis</i> que fermentaron leche durante 12 h.....	46
Tabla 11. Valores de actividad proteasa y peptidasa de cepas de <i>L. lactis</i> que fermentaron leche (< 12 h).....	47
Tabla 12. Valores de actividad peptidasa de sobrenadantes de leches fermentadas por cepas de <i>L. lactis</i> durante 12 h	50

LISTA DE TABLAS (Continuación)

	Página
Tabla 13 Actividad peptidasa de sobrenadantes de leches fermentadas por cepas de <i>L. lactis</i> (< 12 h)	52
Tabla 14. Términos de la ecuación del modelo de regresión lineal múltiple.....	54

RESUMEN

La hipertensión es el riesgo global de mortalidad más importante para la Organización Mundial de la Salud. El mecanismo más usado para reducir la hipertensión es la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Los efectos secundarios de los fármacos inhibidores de la ECA han promovido la búsqueda de soluciones complementarias, entre ellas, el consumo de alimentos funcionales. Se ha demostrado que leches fermentadas con bacterias ácido lácticas específicas (BAL) disminuyen la presión arterial humana. El sistema proteolítico de algunas BAL convierte las proteínas de la leche en péptidos antihipertensivos (PAH). Por lo tanto, sería importante conocer cuáles enzimas del sistema proteolítico son determinantes en la producción de los PAH. El objetivo de este trabajo fue estudiar las actividades de peptidasas específicas de cepas de *Lactococcus lactis* y su relación con la capacidad inhibidora de la actividad ECA en leches fermentadas. Se fermentó leche con 20 cepas diferentes de *Lactococcus lactis* y se determinó el IC₅₀ (concentración de nitrógeno peptídico que inhibe 50% la conversión de angiotensina I a angiotensina II) en el extracto acuoso < 3 kDa de cada leche. Se determinaron las actividades enzimáticas: PrtP, PepA, PepC, PepI, PepN, PepX del contenido intracelular de las cepas y en el sobrenadante de la leche. Además se determinó la capacidad acidificante de las cepas bajo estudio. Finalmente, se relacionó el IC₅₀ con la capacidad acidificante y las actividades enzimáticas por medio de un modelo de regresión lineal múltiple. La actividad PepN del contenido intracelular, la actividad PepC en el sobrenadante y la capacidad acidificante fueron las variables que se relacionaron significativamente con el IC₅₀. El coeficiente de determinación (R²) y probabilidad del modelo fue 0.9943 y 0.0001, respectivamente. En la selección de cepas de *Lactococcus lactis* para producir leches fermentadas con actividad potencialmente antihipertensiva, estas deberán presentar la actividad enzimática PepN en su contenido intracelular. Además, es necesario que las cepas sean autolíticas para que sean capaces de liberar enzima PepC en la leche que fermentan. Por otro lado, también es necesario que las cepas sean acidificantes. El conocimiento generado, podría facilitar la búsqueda de nuevas cepas aisladas de la naturaleza con buena capacidad para generar péptidos antihipertensivos.

Palabras Clave: IC₅₀, Leche Fermentada, Actividad Peptidasa y *Lactococcus lactis*

ABSTRACT

OMS has stated that hypertension is the most important global mortality risk. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition is the most used mechanism to lower human blood pressure. Antihypertensive drugs side effects have promoted the search for complementary solutions such as functional foods consumption. It has been shown that milk fermented with specific lactic acid bacteria (LAB) has lowered blood pressure in human studies. The LAB proteolytic system of some strains converts milk proteins to antihypertensive peptides. Thus, it would be important to know which enzymes of the proteolytic system are decisive to produce these peptides. Therefore, the aim of this study was to relate *Lactococcus lactis* specific peptidase activities with ACE inhibition. Milk was fermented with 20 different *Lactococcus lactis* strains and IC₅₀ (peptide concentration required to inhibit the conversion from angiotensin I to angiotensin II at 50%) of fermented milk fractions (< 3 kDa) was measured. PrtP, PepA, PepC, PepI, PepN and PepX activities were measured from both cell free extracts and milk supernatants. Additionally, the acidifying capacity of each strain was measured. Finally, a linear regression model was established by relating IC₅₀ as the dependent variable with acidifying capacity and enzymatic activities as independent variables. The most important independent variables that related significantly with IC₅₀ were: i) cell free extract PepN activity, ii) supernatant PepC activity and iii) acidifying capacity. The coefficient of determination (R²) and probability (p) of the model were 0.9943 and 0.0001, respectively. In conclusion, the capacity of *Lactococcus lactis* strains for producing antihypertensive fermented milks, was determined by PepN cell free extract activity, as well as PepC released by autolysis in the fermented milk. Additionally, the strains should possess acidifying capacity. This knowledge might help in the search for new strains of *Lactococcus lactis* capable of producing antihypertensive peptides in fermented milk.

Key words: IC₅₀, Fermented milk, Peptidase activity and *Lactococcus lactis*

I. INTRODUCCIÓN

En el informe de riesgos globales a la salud, emitido por la OMS en el año 2009, se consideró a la hipertensión arterial (HTA) como el riesgo de mortalidad global más importante. La hipertensión no sólo es responsable del 12.8% de las defunciones globales anuales, además, causa el 51% de los accidentes cerebrovasculares y el 45% de las cardiopatías isquémicas (OMS, 2009).

Los fármacos más usados en el tratamiento y control de la HTA basan su actividad en la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA). La ECA forma parte del sistema renina-angiotensina que es el regulador principal de la presión arterial humana. El mecanismo de acción del sistema inicia con la liberación del angiotensinógeno; posteriormente, a partir del angiotensinógeno, la enzima renina produce angiotensina I. Más adelante, la ECA convierte la angiotensina I en angiotensina II, un potente vasoconstrictor. Adicionalmente, la ECA inactiva 2 vasodilatadores muy poderosos: La bradiquinina y la calidina. Finalmente, la ECA promueve la liberación de aldosterona, otro vasoconstrictor muy importante. En resumen, al inhibir la ECA no se producen los vasoconstrictores: Angiotensina II y aldosterona; ni se inactivan los vasodilatadores bradiquinina y calidina; por lo que el resultado neto es una disminución de la presión arterial (FitzGerald *et al.*, 2004).

Se usan 2 parámetros para medir la actividad de inhibición de la ECA (AIECA): El porcentaje de actividad inhibidora de la ECA (%AIECA) y el IC_{50} . El primero representa la capacidad de un péptido para inhibir la formación de angiotensina II a partir de angiotensina I; mientras que el segundo parámetro, se define como la concentración a la que un péptido es capaz de inhibir en un 50% la conversión de angiotensina I a angiotensina II (Donkor *et al.*, 2007). Con el fin de inhibir a la ECA se han desarrollado diversos fármacos antihipertensivos comerciales tales como: Captopril®, enalapril® y lisinopril® que se usan ampliamente en el tratamiento de pacientes con hipertensión y/o enfermedades cardiovasculares (Chobanian *et al.*, 2003). No obstante, estos fármacos generan efectos secundarios indeseables tales como:

hipotensión arterial, incremento en los niveles de potasio, disminución de la actividad renal, tos, angioedema, erupciones en la piel y anomalías en la formación del feto (FitzGerald *et al.*, 2004).

Dichos efectos secundarios asociados a los fármacos antihipertensivos han promovido el uso de estrategias no farmacológicas complementarias. La mayoría de estas estrategias han sido dirigidas al cambio de estilo de vida (práctica de ejercicios físicos isotónicos y la psicoterapia de la conducta) y hábitos alimenticios (disminución de la ingestión de sodio, alcohol y la grasa de origen animal). Debido a que la HTA y la alimentación humana guardan una relación estrecha; la industria alimentaria ha colaborado con instituciones de investigación y salud pública, para contribuir al desarrollo de alimentos funcionales, es decir, alimentos que además de aportar nutrientes a la dieta, contengan al menos un tipo de compuesto promotor de la salud y cuyo impacto positivo a la salud se pueda medir. En este particular, aquellos que contengan compuestos bioactivos que ayuden a mantener una presión arterial normal (Tavares *et al.*, 2012).

En este sentido, los productos lácteos fermentados con cepas específicas de bacterias ácido lácticas han demostrado ser fuente importante de péptidos inhibidores de la ECA (Hayes *et al.*, 2007; Korhonen, 2009; Pihlanto *et al.*, 2010). Los péptidos inhibidores de la ECA se obtienen por hidrólisis enzimática de proteínas en: a) la digestión humana, b) experimentos *in vitro* y c) la fermentación de la leche con bacterias ácido lácticas (BAL). Esta última opción resulta ser la más apropiada por inocua y sencilla (Korhonen y Pihlanto, 2006).

Se ha comprobado la AIECA *in vitro* de péptidos obtenidos a partir de productos lácteos fermentados (Donkor *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2009; Qian *et al.*, 2011) y se ha comprobado la capacidad antihipertensiva de estos péptidos en modelos murinos (Chen *et al.*, 2007; Quirós *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2008). Además, en estudios *in vivo* con pacientes hipertensos en estadio I (presión arterial sistólica de 140 a 160 mm Hg), se ha conseguido reducir significativamente la presión arterial de tales pacientes (Takano, 1998; Jauhainen *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2010).

Con la finalidad de potenciar la formación de péptidos antihipertensivos (PAH) derivados de las proteínas lácteas por cepas de BAL, se han estudiado las enzimas involucradas en su liberación (Algaron *et al.*, 2004; Kilpi *et al.*, 2007). Estos autores concluyeron, que el potencial de las BAL para liberar PAH a partir de las proteínas de la leche, era muy impredecible y se controlaba muy precariamente, a pesar del conocimiento detallado del sistema proteolítico de las BAL. Por lo que, sugirieron optimizar los procesos de fermentación de la leche para producir alimentos con la concentración adecuada de PAH a través de la búsqueda y utilización de cepas nativas aisladas de la naturaleza.

En el laboratorio de química y biotecnología de productos lácteos de la coordinación de tecnología de alimentos de origen animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Rodríguez-Figueroa *et al* (2010) obtuvieron valores de IC₅₀ y %AIECA de diferentes conjuntos de péptidos. Tales péptidos se obtuvieron de leches fermentadas con 20 cepas nativas de *Lactococcus lactis* aisladas de cultivos lácticos comerciales, productos lácteos artesanales y vegetales. En términos generales, los IC₅₀ mas bajos fueron obtenidos por las cepas aisladas de productos lácteos artesanales, sin embargo, los valores obtenidos presentaron un amplio rango de variación; lo cual despertó el interés de investigar cuáles actividades enzimáticas, de las cepas evaluadas, eran determinantes en la formación de los péptidos inhibidores de la ECA.

En particular, es importante considerar que la formación de péptidos antihipertensivos podría estar determinada por la intervención de diferentes peptidasas actuando de manera simultanea durante el proceso de fermentación de la leche. Por lo anterior, en este trabajo se evaluaron las diferentes actividades enzimáticas de cepas nativas de *Lactococcus lactis* en leche y se relacionaron con los valores de IC₅₀, con el objetivo de determinar cuáles de estas enzimas estaban involucradas en la formación de PAH. El conocimiento generado, podría facilitar la búsqueda de nuevas cepas aisladas de la naturaleza con buena capacidad para generar péptidos antihipertensivos.

II. ANTECEDENTES

2.1. Bacterias Ácido Lácticas

Las BAL están compuestas de 16 géneros de bacterias Gram positivas: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Micrococcus* y *Bifidobacterium*. Es difícil adoptar una definición puntal que se cumpla en todas las cepas de BAL. Son un grupo heterogéneo incluso en términos taxonómicos. Aún así, todas las BAL comparten las siguientes características: a) producen ácido láctico a partir de hexosas, b) carecen de citocromos o sistemas de transporte de electrones asociados a grupos hemo, c) simultáneamente, obtienen energía fosforilando sustratos y oxidando carbohidratos, d) no cuentan con un ciclo de Krebs funcional, e) no forman esporas, f) no tienen motilidad y g) son catalasa-negativas (Pierre *et al.*, 2008).

Tomando en cuenta los productos de la fermentación, las BAL pueden clasificarse en: a) homofermentativas (BAL-HM) o heterofermentativas (BAL-HT). Las BAL-HM producen principalmente ácido láctico a partir de la glucosa y obtienen el doble de energía que las BAL-HT. Se llama homofermentativa a una cepa cuando metaboliza glucosa, pero no se considera homofermentativa cuando metaboliza pentosas. Algunas BAL-HM producen ácido láctico y acético cuando metabolizan pentosas (Jay *et al.*, 2005).

Las BAL-HT producen cantidades molares equivalentes de ácido láctico, CO₂ y etanol. Suelen desplazar a las BAL-HM al modificar ciertas condiciones de crecimiento óptimas tales como: Concentración de glucosa, pH y disponibilidad de ciertos nutrientes. Todas las especies de los géneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, y *Vagococcus* son BAL-HM al igual que algunas especies del género *Lactobacillus*. Todas las especies de los géneros: *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* y algunas especies del género *Lactobacillus*; son BAL-HT. Las BAL-HT producen más

compuestos responsables del aroma (acetaldehído y diacetilo, entre otros) que las BAL-HM (Jay *et al.*, 2005; Tamime *et al.*, 2006).

Los medios sintéticos donde crecen las BAL deben incluir: Aminoácidos, vitaminas del grupo B, purinas y pirimidinas; por tratarse de nutrientes esenciales para su crecimiento óptimo. A pesar de que las BAL se consideran mesófilas, algunas crecen a temperaturas menores a 5°C, en tanto que otras crecen incluso a temperaturas de 45°C. Algunas BAL crecen a valores de pH muy bajos (3.2) en tanto que otras pueden crecer a valores de pH muy altos (9.6); la mayoría crece en un intervalo de valores de PH de 4.0 a 4.5. En algunas BAL del género *Lactococcus*, los genes que codifican las enzimas indispensables para fermentar lactosa, se encuentran en plásmidos. La pérdida de un plásmido provocaría que la BAL perdiera su capacidad para fermentar lactosa (Leroy *et al.*, 2004).

Las BAL-HM poseen las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa pero carecen de una fosfocetolasa. Por lo que usan la ruta metabólica EMP (Embden–Meyerhof–Parnas) para producir 2 moléculas de ácido láctico a partir de 1 molécula de glucosa. Por su parte, las BAL-HT poseen la enzima fosfocetolasa pero no cuentan con las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa; en vez de metabolizar la glucosa por la ruta metabólica EMP, usan la ruta metabólica de la pentosa o de la hexosa monofosfato (Jay *et al.*, 2005; Walstra *et al.*, 2006).

2.2. La Fermentación de la Leche

La reacción más importante que ocurre durante la fermentación de la leche, es la conversión de la lactosa en ácido láctico. Las enzimas glicolíticas de las BAL juegan un papel esencial en esta conversión. En términos bioquímicos, la fermentación es un proceso metabólico donde la lactosa y otros compuestos relacionados, se oxidan parcialmente. Durante esta oxidación, liberan energía en la ausencia de cualquier otro aceptor de electrones externo. Los aceptores finales de electrones, son compuestos orgánicos producidos a partir de la degradación directa de la lactosa y compuestos

relacionados. En consecuencia, ocurre una oxidación incompleta del compuesto original y únicamente se libera una cantidad pequeña de energía durante el proceso. Los productos representativos de la fermentación son compuestos orgánicos que se han reducido más que otros (Jay *et al.*, 2005).

Una leche fermentada natural es el producto lácteo obtenido durante la fermentación de la leche por la acción de microorganismos adecuados. Se produce una disminución de pH del producto, con o sin precipitación isoléctrica de las proteínas. Los microorganismos presentes en la leche fermentada deben de estar viables, activos y en la cantidad adecuada, hasta la fecha de caducidad. Una leche fermentada puede ser: a) natural, b) compuesta, c) con tratamiento térmico y d) concentrada. Ciertas leches fermentadas se caracterizan por el uso de cultivos iniciadores específicos (Tabla 1). Se pueden incluir otros microorganismos inoos en el cultivo iniciador (Norma CODEX STAN 243-2003 de *Codex Alimentarius*; Tamime *et al.*, 2006).

Una bebida derivada de una leche fermentada es el ejemplo más importante de una leche fermentada compuesta; se trata de una mezcla de leche fermentada con agua potable, con o sin la adición de otros ingredientes tales como: Suero, ingredientes de origen no lácteo y saborizantes; debe contener un mínimo de leche fermentada de 40% (m/m), se le puede agregar CO₂ y puede tener aditivos que se encuentran presentes en los ingredientes de origen no lácteo (Norma CODEX STAN 243-2003 de *Codex Alimentarius*; Tamime *et al.*, 2006).

La materia prima esencial de las leches fermentadas debe ser leche y/o productos obtenidos de la leche. A las leches fermentadas naturales se les podrán agregar gomas y/o almidón sólo si lo permite la legislación nacional del país donde se vende el producto al consumidor. Aún así, deben agregarse en la cantidad necesaria para impartir funcionalidad al producto y cumpliendo con las buenas prácticas de manufactura (Norma CODEX STAN 243-2003 del *Codex Alimentarius*).

Tabla 1. Microorganismos usados en la producción de leches fermentadas específicas

Leche fermentada	Microorganismo ¹
Yogur	Cultivos simbióticos de: <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Yogur con cultivos alternativos	Cultivos de <i>Streptococcus thermophilus</i> y cualquier otra especie del género <i>Lactobacillus</i>
Leche Acidophilus	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Kefir	<i>Lactobacillus kefir</i> , especies de los géneros <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> y <i>Acetobacter</i> . Levaduras que fermentan lactosa (<i>Kluyveromyces marxianus</i>) y levaduras que no fermentan lactosa (<i>Saccharomyces unisporus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Saccharomyces exiguus</i>)
Kumys	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Kluyveromyces marxianus</i>

¹Se pueden incluir otros microorganismos inocuos en el cultivo iniciador

El contenido de proteína de la leche fermentada natural debe ser al menos de un 2.7% (m/m), el contenido de grasa de origen lácteo no debe exceder el 10% (m/m), la acidez titulable expresada como porcentaje de ácido láctico debe ser al menos de un 0.3% (m/m), la cantidad de microorganismos presentes en el cultivo iniciador debe ser al menos de 10^7 UFC g^{-1} , si en la etiqueta del producto se hace alusión a otro microorganismo específico suplementado junto con el cultivo iniciador, la cantidad de este microorganismo específico debe ser al menos de 10^6 UFC g^{-1} . Para las bebidas derivadas de leche fermentada los criterios anteriores aplican únicamente para la fracción de leche fermentada. Los criterios microbiológicos basados en la proporción de leche fermentada deben cumplirse hasta la fecha de caducidad del producto. El cumplimiento de tales criterios debe verificarse con análisis microbiológicos del producto desde el inicio de su almacenamiento y hasta la fecha de caducidad. No se

permite la remoción del suero de la leche fermentada después de la fermentación (Norma CODEX STAN 243-2003 del *Codex Alimentarius*; Tamime *et al.*, 2006).

2.3. *Lactococcus lactis*

2.3.1. Hábitats

El hábitat más importante de *L. lactis* es la industria láctea. El género *Lactococcus* comprende las especies: *L. lactis*, *L. garviae*, *L. plantarum*, *L. piscium* y *L. raffinolactis*. Se ha encontrado a *L. lactis* subsp. *lactis* y a *L. lactis* biovar. *diacetylactis* en la industria láctea. También se encuentra en vegetales: maíz fresco, maíz congelado, estigma de maíz, frijol blanco, col, lechuga, chícharo, trigo entero, pasto, trébol, papa, pepino y melón. *L. lactis* no se encuentra en materia fecal o suelo (Wouters *et al.*, 2002).

Se han encontrado unas cuantas cepas de *L. lactis* en la superficie y saliva de vacas. En cambio se han encontrado numerosas cepas de *L. lactis* y sus subespecies *lactis* y *cremoris* en: leche cruda, maquinaria y ubre; a concentraciones de 10^3 UFC g⁻¹. Al enriquecer el medio de crecimiento es posible encontrarlos también en: saliva de vaca, piel de toro y vaca, pasto, suelo y ensilado. Por otra parte, en plantas lácteas, se han encontrado varias especies del género *Lactococcus* en: leche, suero y contenedor de agua residual. Tras enriquecer el medio de crecimiento, se encuentran cepas de *L. lactis* en sitios que alojan contenedores de aguas residuales, en suelo y en pasto. En la leche se encuentra a: *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* biovar. *diacetylactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*; lo que sugiere que las cepas llegan a la leche del exterior de la ubre y durante la ordeña y alimentación de la vaca. Los hábitats principales de *L. lactis* subsp. *cremoris* son: leche cruda, leche fermentada, quesos y cultivos comerciales. (Teuber *et al.*, 2006).

En otros estudios, se han aislado BAL del género *Lactococcus* de animales y se ha detectado a *L. lactis* subsp. *lactis* en: intestino bovino, leche de vaca sana, leche de vaca con mastitis y amígdalas de: gatos, perros y cabras. Pero definitivamente, el hábitat principal de *L. lactis* es la vaca lechera, su leche y el medio ambiente que les rodea (Teuber *et al.*, 2006).

2.3.2. Auxotrofia

L. lactis no sintetiza varios aminoácidos por lo que deben incluirse en el medio de crecimiento. A *L. lactis* le faltan ciertos genes que codifican enzimas que participan en reacciones de síntesis o mecanismos de regulación específicos. El número de aminoácidos esenciales que debe agregarse al medio de crecimiento, depende de la cepa. Este número fluctúa desde 6 para *L. lactis* subsp. *lactis* hasta 14 para *L. lactis* subsp. *cremoris* (Wouters *et al.*, 2002). La falta de rutas metabólicas para sintetizar aminoácidos, en cepas de *L. lactis* de origen lácteo, podría ser consecuencia de su adaptación al ecosistema de la leche. El medio sintético diseñado para cultivar a *L. lactis* debe incluir: a) aminoácidos (Isoleucina, valina, leucina, histidina, metionina, arginina, y prolina) y b) vitaminas (niacina, pantotenato cálcico y biotina) (Cogan *et al.*, 2007).

2.3.3. Metabolismo de lactosa

La formación de ácido láctico inicia con la fosforilación de la glucosa e involucra a una fosfotransferasa asociada a la membrana celular. Posteriormente, una fosfo- β -galactosidasa convierte la glucosa-6-fosfato en glucosa y galactosa-6-fosfato, la cual será metabolizada subsecuentemente por la ruta metabólica de la tagatosa-1-fosfato. El L(+)-lactato es el producto principal de la glicólisis. Los valores bajos de pH de la leche fermentada (4.0–5.6), comparados con los de la leche sin fermentar (6.6–6.7), previenen o retardan el crecimiento tanto de bacterias patógenas como de bacterias que descomponen el alimento; entre las últimas se encuentran especies de los géneros: *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae* y géneros de bacterias Gram-negativas psicrotolerantes como *Pseudomonas*. La caseína precipita si el pH disminuye hasta alcanzar su punto isoeléctrico (4.6–4.8). Este efecto es deseable al cuajar la leche en la elaboración de: queso cottage, leche ácida, yogur y caseína. Las BAL iniciadoras para este propósito son: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris* (Además de *Lactobacillus* y *Streptococcus thermophilus*) (Jay *et al.*, 2005; Teuber *et al.*, 2006).

2.3.4. Metabolismo de ácido cítrico

El citrato se encuentra disuelto en la leche (0.1% p/v) y forma parte de las micelas de caseína en el complejo caseína-citrato-calcio-fosfato. A partir de citrato se obtiene el

diacetilo que es el compuesto del aroma más característico de *L. lactis* biovar. *diacetylactis*. La obtención de diacetilo inicia con la formación de oxaloacetato que luego se transforma a piruvato para convertirse finalmente en α -acetolactato con la liberación de 2 moléculas de CO₂. La presencia de CO₂ es deseable en la formación de las cavidades del queso. El CO₂ es indeseable cuando provoca que flote la cuajada durante la elaboración de queso cottage. Los resultados indeseables durante la fermentación de la leche suelen ser originados por el uso de cultivos comerciales inadecuados (Teuber *et al.*, 2006; Walstra *et al.*, 2006).

2.3.5. Diseño de cultivos iniciadores apropiados

Los productos lácteos fermentados (PLF) se fabrican casi siempre con cultivos iniciadores comerciales (CIC). Se usan cultivos liofilizados, congelados y líquidos. Los microorganismos de los CIC deben tener una tasa de viabilidad alta y conservar una actividad óptima, que guarda relación con el rendimiento tecnológico que se espera de ellos. Por ejemplo, La fermentación de lactosa a lactato, la proteólisis controlada de caseína y la producción de compuestos del aroma como diacetilo. Los genes que codifican las enzimas indispensables para la fermentación de la lactosa y el citrato; al igual que para ciertas proteasas, se localizan en plásmidos. La propagación continua de los CIC no tiene éxito porque se forman rápidamente cepas inadecuadas. En la mayoría de los casos, el medio básico para la producción de CIC a gran escala ha sido leche desnatada estéril o pasteurizada. Con ella se asegura, que sólo se desarrollarán las bacterias del género *Lactococcus*, que se adaptan plenamente a un sustrato complejo como lo es la leche (Walstra *et al.*, 2006; Cogan *et al.*, 2007).

En el caso de los CIC líquidos, la leche se suplementa con: extracto de levadura, glucosa, lactosa y carbonato de calcio. Para conservar la viabilidad y actividad óptima del cultivo, podría ser necesario neutralizar el ácido láctico producido con hidróxido de amonio o sodio. Muchas cepas del género *Streptococcus* de origen lácteo, producen peróxido de hidrógeno durante su crecimiento bajo condiciones microaerofílicas, por lo que se suele agregar catalasa al medio de cultivo, para obtener más de 10^{10} UFC mL⁻¹ (Teuber *et al.*, 2006; Cogan *et al.*, 2007).

En la preparación de CIC concentrados, el medio se clarifica por digestión proteolítica de la leche desnatada con papaína o enzimas bacterianas; para evitar la precipitación de la caseína en el separador que se usa para colectar la biomasa. Los clarificadores con sistemas de autolimpieza disponibles, concentran el caldo de fermentación a 10^{12} UFC mL^{-1} . Estos cultivos concentrados pueden liofilizarse o mejor Aún; congelarlos por goteo en nitrógeno líquido. Los agregados que se forman, se colocan en latas o cajas de cartón y se conservan a -70°C durante su transporte y almacenamiento (usando hielo seco). Estos cultivos modernos se agregan directamente a la tina de quesería porque las cepas se encuentran en su fase logarítmica tardía de crecimiento. Gracias a este tipo de tecnología, la mayor parte de la responsabilidad del manejo microbiológico, se transfiere de la planta de PLF al productor del CIC. El CIC líquido clásico con 10^9 UFC mL^{-1} y el CIC liofilizado tradicional con 10^{11} UFC g^{-1} sólo necesitan propagarse en la planta más adelante (Teuber *et al.*, 2006; Walstra *et al.*, 2006).

Los CIC liofilizados pueden transportarse y almacenarse fácilmente a temperatura ambiente durante varios meses. Aunque los CIC liofilizados y concentrados también son adecuados para vaciarlos en la tina de quesería; se debe tener en cuenta que las cepas presentarán una fase breve de crecimiento LAG antes de reanudar su crecimiento exponencial. La inoculación directa en la tina, tiene la ventaja de proteger a las cepas del cultivo de la presencia de bacteriófagos, que son comunes en los sistemas abiertos de fermentación (Leroy *et al.*, 2004; Teuber *et al.*, 2006).

2.3.6. Cepas nativas de *L. lactis*

Las BAL mesófilas del género *Lactococcus* se asocian generalmente a ecosistemas de origen lácteo, sin embargo, también se les ha aislado de otros ecosistemas. A las BAL del género *Lactococcus*, aisladas de productos lácteos artesanales (sin el uso de CIC) y de nichos no lácteos, se les conoce como cepas nativas (Leroy *et al.*, 2004; Walstra *et al.*, 2006).

En un proyecto internacional financiado por la comunidad europea, se aislaron y caracterizaron parcialmente, un gran número de cepas nativas del género *Lactococcus*. Los estudios preliminares revelaron, que entre las cepas de BAL aisladas, había muchas cepas de *L. lactis* que eran diferentes de las cepas presentes en los CIC. Las cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* de los CIC se caracterizan por su capacidad de hidrolizar arginina, metabolizar varios carbohidratos, crecer a 40°C y/o crecer en presencia de NaCl (4%). Sin embargo, las cepas de la subespecie *cremoris*, no pueden crecer bajo estas condiciones. Aunque la mayoría de las cepas nativas aisladas exhibieron el mismo comportamiento que las cepas presentes en los CIC, las características fenotípicas de algunas cepas no coincidieron con las de su contraparte. Adicionalmente, algunas cepas con un perfil fenotípico de *L. lactis* subsp. *lactis*, mostraron un perfil genotípico de *L. lactis* subsp. *cremoris* y viceversa. Las pruebas que se usan normalmente para caracterizar el fenotipo de una cepa, podrían proporcionar resultados ambiguos, al emplearlas con cepas nativas; lo que conduciría a clasificar erróneamente las nuevas especies (Wouters *et al.*, 2002).

Las cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* se aíslan normalmente de nichos naturales, en tanto que las cepas con fenotipo de *L. lactis* subsp. *cremoris* se aíslan únicamente de ecosistemas lácteos. El hábitat original de esta última subespecie sigue sin conocerse, se cree que no sobreviviría en nichos naturales y podría estar confinada exclusivamente al ecosistema lácteo. Estudios de biología molecular que clasifican BAL, empleando la metodología de amplificación aleatoria de DNA polimórfico, han revelado que las cepas nativas del género *Lactococcus* tienen perfiles diferentes que su contraparte presente en CIC. Es posible y muy probable que los hábitats naturales, incluyendo la leche cruda, pudiesen albergar cepas nuevas de BAL del género *Lactococcus* con aplicación potencial en el desarrollo de nuevos PLF (Wouters *et al.*, 2002; Jay *et al.*, 2005).

La cepa comercial de *L. lactis* subsp. *cremoris* necesita en su medio de crecimiento de 9 a 10 aminoácidos, en tanto que las cepas nativas de *L. lactis* subsp. *lactis* y *cremoris* necesitan sólo de 1 a 3. Durante la fermentación de la leche, las proteínas son convertidas en aminoácidos, por la acción del sistema proteolítico de *L. lactis*. En

consecuencia, el número de enzimas que se usan en la síntesis de aminoácidos es limitado. Por el contrario, las cepas nativas no se encuentran en un medio rico en proteínas, como la leche. Esta restricción en el medio de crecimiento de las cepas nativas, hace que dependan más de su propia capacidad para sintetizar aminoácidos. Probablemente las cepas nativas, vayan albergando cada vez más y más convertasas de aminoácidos. Las convertasas juegan un papel esencial en la formación de compuestos del aroma a partir de aminoácidos. Las cepas nativas deberían seguirse aislando y caracterizando para evaluar su capacidad de formar nuevos aromas en los PLF (Wouters *et al.*, 2002; Tamime *et al.*, 2006).

2.4. Las Proteínas de la Leche

Las proteínas de la leche tienen una calidad nutritiva de gran valor biológico. Esto se debe a que la leche será el único alimento de la cría de la vaca durante el inicio de su vida. En promedio, el contenido de proteína de la leche de ganado vacuno occidental es de 3.2%. Las proteínas de la leche pueden ser caseínas o proteínas séricas. Las caseínas pueden ser: α_s1 , α_s2 , β y κ . Las proteínas séricas más importantes son la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina. Las caseínas forman micelas (complejos esféricos) al asociarse con fosfato de calcio. Las caseínas constituyen el 80% de las proteínas de la leche y las proteínas séricas constituyen el 20% restante (Tabla 2).

Las caseínas tienen un contenido elevado de residuos de prolina a lo largo de toda su estructura primaria, Aunado a ello, las caseínas α_s1 y α_s2 tienen un número considerable de residuos de fosfoserina (Tabla 3). Estas características hacen que las caseínas carezcan virtualmente de una estructura secundaria y terciaria definida. La falta de tal estructura promoverá las reacciones enzimáticas de hidrólisis, durante la fermentación de la leche con BAL (Savijoki *et al.*, 2006; Fennema *et al.*, 2007).

2.5. El Sistema Proteolítico de *L. lactis*

El sistema proteolítico de *L. lactis* se ha caracterizado a detalle. Se sabe que inicia con la acción de una proteasa sobre las proteínas de la leche para convertirlas en: Oligopéptidos de 4 a 18 residuos, tripéptidos y dipéptidos. Posteriormente, 3 mecanismos de transporte específicos (Opp, DptP y Dpp) se encargan de introducir los péptidos al citoplasma. En el citoplasma, la acción conjunta de 11 peptidasas, convierten los péptidos en aminoácidos necesarios para el crecimiento celular. Durante este proceso se forman también péptidos antihipertensivos. El conocimiento del sistema proteolítico de las BAL se ha publicado y actualizado en diferentes artículos de revisión. (Kok *et al.*, 1990; Kunji *et al.*, 1996; Law *et al.*, 1997; Christensen *et al.*, 1999; Savijoki *et al.*, 2006; Mayo *et al.*, 2010).

Tabla 2. Distribución de proteínas en la leche¹

Proteína	Concentración (g L ⁻¹)	% de proteína	% de proteína total
Caseínas	26.00		80
Fracción α_s	17.00	42	
Fracción α_s1	13.50	34	
Fracción α_s2	3.50	8	
Fracción β	10.00	25	
Fracción κ	3.50	9	
Fracción γ	1.50	4	
Proteínas séricas	6.00		20
β -lactoglobulinas	3.00	9	
α -lactoalbúmina	1.25	4	
Proteosas-peptonas	1.20	4	
Proteínas de la sangre			
Albúmina sérica	0.25	1	
Inmunoglobulinas	0.80	2	

¹De ganado vacuno occidental

Tabla 3. Distribución de aminoácidos en proteínas de la leche de ganado vacuno occidental

Aminoácidos	Caseína α_s1	Caseína α_s2	Caseína κ	Caseína β	Caseína γ_1 (f29-209) de caseína β	Caseína γ_1 (f106-209) de caseína β	Caseína γ_1 (f108-209) de caseína β	Lacto globulina β	Lacto albúmina α
Apolares									
Pro	17	10	20	35	35	21	21	8	2
Ala	9	8	14	5	5	2	2	14	3
Val	11	14	11	19	17	10	10	10	6
Met	5	4	2	6	6	4	4	4	1
Ile	11	11	12	10	7	3	3	10	8
Leu	17	15	8	22	19	14	14	22	13
Phe	8	9	4	9	9	5	5	4	3
Trp	2	2	1	1	1	1	1	1	4
Polares neutros									
Asn	8	13	8	5	3	1	1	5	12
Thr	5	16	14	9	8	4	4	10	8
Ser	8	6	12	11	10	7	7	7	7
Gln	14	16	14	21	21	11	11	9	6
Gly	9	3	2	5	4	2	2	3	6
Tyr	10	10	9	4	4	3	3	2	4
Cistina	0	1	1	0	0	0	0	2	4
Cys	0	1	1	0	0	0	0	3	4
Pyr-Glu	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Polares ácidos									
Asp	7	3	5	4	4	2	2	12	9
Ser-P	8	11	1	5	1	0	0	0	0
Glu	25	24	12	18	11	4	4	16	8
Polares básicos									
Lys	14	21	9	11	9	4	3	15	12
His	5	3	3	5	5	4	3	2	3
Arg	6	6	5	4	2	2	2	3	0
Número de residuos totales	199	207	169	209	181	104	102	162	123

2.5.1. Proteasa de *Lactococcus lactis*

La proteasa (PrpP) de *L. lactis* está anclada a la pared celular e hidroliza las proteínas de la leche para convertirlas en oligopéptidos, tripéptidos y dipéptidos. Los genes que codifican PrpP se encuentran en genoma y plásmidos. PrpP se sintetiza como una preproteína de *ca.* dos mil residuos y tiene ocho dominios funcionales distintos (Mayo *et al.*, 2010).

Tabla 4. Proporción de aminoácidos en proteínas de leche¹

Identificador de una letra	Identificador de tres letras	Nombre	Proporción
P	Pro	Prolina	10.77%
E	Glu	Ácido Glutámico	10.29%
L	Leu	Leucina	9.23%
Q	Gln	Glutamina	8.04%
V	Val	Valina	6.96%
K	Lys	Lisina	6.83%
I	Ile	Isoleucina	5.47%
S	Ser	Serina	4.67%
T	Thr	Treonina	4.49%
A	Ala	Alanina	4.34%
F	Phe	Fenilalanina	3.84%
N	Asn	Asparagina	3.82%
Y	Tyr	Tirosina	3.63%
D	Asp	Ácido aspártico	3.16%
G	Gly	Glicina	3.03%
Ninguna	Ninguna	Fosfoserina	2.86%
R	Arg	Arginina	2.45%
M	Met	Metionina	2.42%
H	His	Histidina	2.21%
W	Trp	Triptófano	0.82%
C	Cys	Cisteína	0.33%
Ninguna	Ninguna	Cistina	0.28%
Ninguna	Ninguna	Ácido piroglutámico	0.05%

¹De ganado vacuno occidental

2.5.1.1. Estructura. Los ocho dominios, partiendo de residuo amino-terminal (residuo N) a residuo carboxi-terminal (residuo C) (de exterior a interior de la célula), son: a) predominio PP que corresponde a una secuencia de señalización de *ca.* cuarenta residuos, involucrada en tareas de secreción. El predominio PP cuenta además con una prosequencia de *ca.* ciento cincuenta residuos que se remueve por procesamiento autocatalítico. b) dominio catalítico PR de una serín proteasa de *ca.* quinientos residuos. c) dominio I de inserción de *ca.* ciento cincuenta residuos, unido al dominio PR, modula la especificidad del sustrato. d) dominio A de *ca.* cuatrocientos residuos, sirve para exponer el dominio PR fuera de la pared celular. e) dominio B de *ca.* quinientos

residuos, está involucrado en estabilizar la actividad y especificidad. f) dominio H helicoidal de *ca.* doscientos residuos, involucrado en posicionamiento de dominios A y B en exterior de pared celular. g) dominio hidrofílico W de *ca.* cien residuos, ocupa el espesor total de la pared celular. h) dominio AN de anclaje a la pared celular, contiene una señal de clasificación característica de muchas proteínas de la superficie de bacterias Gram positivas (Siezen *et al.*, 1999).

El gen que codifica PrtP es precedido por un gen transcrito divergentemente que codifica una lipoproteína unida a la membrana celular y que es PrtM. PrtM demostró ser esencial para la maduración autocatalítica de PrtP (Siezen *et al.*, 1999).

PrtP es un monómero con masa molecular entre 180 y 190 kDa. PrtP muestra homología con las subtilisinas. Al comparar la secuencia amino-terminal (secuencia N) de la proteína madura, con la secuencia deducida a partir de nucleótidos, se observa una secuencia de señalización típica de translocación, que es removida por procesamiento postranslacional. En el dominio AR se encuentra la secuencia LPXTG. Después de la traslocación de PrtP, se rompe el enlace entre T y G; para unir covalentemente a la Treonina, con el extremo N-terminal (extremo N) de un residuo de glicina, presente en la capa de peptidoglicano (Mayo *et al.*, 2010).

2.5.1.2. Especificidad. PrtP prefiere proteínas hidrofóbicas como las caseínas de la leche. PrtP se clasifica en PI y PIII. PI hidroliza principalmente β -caseína y produce más de 100 oligopéptidos diferentes de 4 a 30 residuos. PI hidroliza en menor grado a la κ -caseína. PIII hidroliza con la misma eficiencia α _{S1}-, β - y κ -caseína. PrtP habilita a la autolisina, necesaria durante la división celular y en la autólisis (durante la fase estacionaria de crecimiento). La tasa y grado de autólisis depende de la especificidad, localización y cantidad de PrtP (Exterkate *et al.*, 1993; Savijoki *et al.*, 2006).

2.5.2. Mecanismos de transporte de Péptidos

Los péptidos producidos por PrtP, pueden ingresar al citoplasma de *L. lactis* usando 3 sistemas de transporte específicos (Opp, DtpT y Dpp). Los genes que codifican el

sistema Opp (Oligo Peptide Permease por sus siglas en inglés) de *L. lactis* MG1363 se encuentran en un operón. Estos genes codifican: a) la proteína que se une al oligopeptido (OppA), las 2 proteínas que se unen a la membrana (OppB and OppC) y las 2 proteínas que se unen a los nucleótidos intracelulares (OppD and OppF). El sistema Opp de *L. lactis* es capaz de transportar péptidos de hasta 18 residuos (Kunji *et al.*, 1993; Doeven *et al.*, 2005).

Además de Opp, se han caracterizado otros 2 sistemas de transporte de péptidos en cepas de *L. lactis* MG1363 y IL1403. Uno de ellos es DtpT que es capaz de transportar dipéptidos y tripéptidos mediante fuerza motriz de protones. El otro es Dpp y transporta dipéptidos, tripéptidos y tetrapéptidos usando moléculas de ATP. Los péptidos transportados por Dpp contienen un número elevado de residuos hidrofóbicos de cadena ramificada, Dpp tiene una gran afinidad por tripéptidos. Por su parte, DtpT prefiere transportar péptidos más hidrofílicos y con carga (Savijoki *et al.*, 2006).

2.5.3. Las 11 peptidasas intracelulares de *Lactococcus lactis*

Las cepas de *L. lactis* son incapaces de sintetizar una cantidad de aminoácidos que fluctúa entre seis y catorce. La capacidad de *L. lactis* para crecer a densidades celulares altas depende de su sistema proteolítico, que puede liberar aminoácidos esenciales a partir de los péptidos derivados de la caseína. Se han identificado y cuantificado los péptidos obtenidos a partir de la hidrólisis de la β -caseína pura con cepas de *L. lactis*. Los resultados indican que la mayor parte de los aminoácidos esenciales pueden obtenerse a partir del extremo C de la β -caseína purificada (f161–191). La excepción fue Histidina, que previamente se había demostrado que debía incluirse en el medio durante el crecimiento de *L. lactis* en β -caseína purificada. Opp transportó de diez a catorce péptidos que tenían de cinco a diez residuos. Sin embargo, análisis cinéticos posteriores de Opp indicaron que los péptidos desde cuatro y hasta cuando menos dieciocho residuos podían transportarse con poca especificidad debido a la presencia de cadenas laterales en particular. Estos estudios empezaron a definir los sustratos potenciales disponibles para las peptidasas de *L. lactis* durante su crecimiento en leche (Tynkkynen *et al.*, 1999; Christensen *et al.*, 1999).

Se han usado sustratos sintéticos de para-nitroanilina (pNA) y beta-naftilamida (β NAP) para evaluar la actividad enzimática de peptidasas en 40 oligopéptidos, 100 tripéptidos y 180 dipéptidos; con el objetivo de establecer con claridad la especificidad de cada peptidasa. Los aminoácidos de los sustratos naturales (no cromogénicos) se clasificaron de acuerdo a sus características (hidrofilicidad, carga y agrupación por cadena lateral). Los datos se clasificaron respecto al orden y clase de aminoácido, lo que derivó en la agrupación de péptidos con características comunes. Por ejemplo, Ala-Phe y Leu-Tyr se agruparon juntos (hidrofóbico-aromático); Lys-Pro e His-Pro formaron otro grupo (básico-imino). Las generalizaciones importantes de la hidrólisis de los sustratos se incluyeron en la descripción individual de la peptidasa (Tabla 6).

Es conveniente identificar y clasificar peptidasas con sustratos cromogénicos sintéticos y péptidos pequeños. No obstante, esta información debe interpretarse cuidadosamente, el papel específico de alguna de estas peptidasas en la hidrólisis de péptidos exógenos o en fisiología celular general, podría no elucidarse con el uso de ellos. (El Soda *et al.*, 1982; Christensen *et al.*, 1999).

Endopeptidasas PepO y PepO2. PepO es una metal peptidasa monomérica de setenta kDa capaz de hidrolizar péptidos desde cinco residuos (Met- y Leu-encefalina) hasta treinta y cinco residuos (α_5 1-caseína, (f165-199)). Asimismo, hidroliza: bradiquinina, angiotensina, neurotensina e insulina de cadena β . *L. lactis* MG1363 codifica una segunda endopeptidasa con propiedades similares a PepO, llamada PepO2. Al igual que la termolisina, varios puntos de hidrólisis de PepO ocurren en enlaces donde Leu o Phe ocupan la posición P1N. En general, la afinidad y tasa de hidrólisis de YGGF(X)_n aumenta a medida que n aumenta de uno a trece (Mierau *et al.*, 1993; Tynkkynen *et al.*, 1993; Nardi *et al.*, 1997; Christensen *et al.*, 1999; Mayo *et al.*, 2010).

Endopeptidasa PepF1. A una tercer peptidasa con especificidad diferente a PepO y PepO2 se le ha nombrado PepF1. Es una metal peptidasa monomérica de setenta kDa,

que hidroliza péptidos desde siete residuos (β -casomorfin, f60-66) hasta diecisiete residuos (hormona adrenorticotrópica (ACTH), f1-17), con una especificidad muy

Tabla 5. Peptidasas de BAL caracterizadas genéticamente

Peptidasa	Cepa	Clase catalítica ¹	Especificidad ²	Referencia
Endopeptidasa PepO	<i>L. lactis</i> P8-2-47	M	NH ₂ -X _n ↓X _n -COOH	Mierau <i>et al.</i> 1993
	<i>L. lactis</i> SSL135			Tynkkynen <i>et al.</i> 1993
Endopeptidasa PepO2	<i>L. lactis</i> IL1403/NCDO763	M	NH ₂ -X _n ↓X _n -COOH	Nardi <i>et al.</i> 1997
Endopeptidasa PepF1	<i>L. lactis</i> NCDO763	M	NH ₂ -X _n ↓X _n -COOH	Monnet <i>et al.</i> 1994
Endopeptidasa PepF2	<i>L. lactis</i> IL1403/NCDO763	M	NH ₂ -X _n ↓X _n -COOH	Nardi <i>et al.</i> 1997
Aminopeptidasa PepC	<i>L. lactis</i> AM2	C	NH ₂ -X↓X _n -COOH	Chapot-Chartier <i>et al.</i> 1993
Aminopeptidasa PepN	<i>L. lactis</i> Wg2	M	NH ₂ -X↓X _n -COOH	Strømman 1992
	<i>L. lactis</i> MG1363			Tan <i>et al.</i> 1992
Aminopeptidasa PepA	<i>L. lactis</i> FI1876	M	NH ₂ -Glu↓X _n -COOH NH ₂ -Asp↓X _n -COOH	I'Anson <i>et al.</i> 1995
Aminopeptidasa PepX	<i>L. lactis</i> NCDO763	S	NH ₂ -X-Pro↓X _n -COOH	Nardi <i>et al.</i> 1991
Aminopeptidasa PepP	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCDO763	M	NH ₂ -X↓Pro-X _n -COOH	Matos <i>et al.</i> 1998
Tripeptidasa PepT	<i>L. lactis</i> MG1363	M	NH ₂ -X↓X _n -X-COOH	Mierau <i>et al.</i> 1994
Dipeptidasa PepV	<i>L. lactis</i> MG1363	M	NH ₂ -X↓X-COOH	Hellendoorn <i>et al.</i> 1997

¹M = metal peptidasa, C = cisteín peptidasa y S = serín peptidasa. ²X_n representa a un residuo localizado entre otros 2 residuos. X representa a un residuo unido directamente a un grupo amino o carboxilo

amplia. Hidroliza HATC (f1-17) en 3 posiciones, liberando péptidos de tres a siete residuos. No hidroliza: glucagón (veintinueve residuos) o insulina de cadena β (treinta residuos), sugiriendo que el límite máximo de residuos presentes en el péptido a hidrolizar es menor a veinticuatro (Monnet *et al.*, 1994; Nardi *et al.*, 1997; Christensen *et al.*, 1999; Savijoki *et al.*, 2006; Mayo *et al.*, 2010).

Endopeptidasa PepF2. En *L. lactis* subsp. *cremoris* NCDO763 se han encontrado dos copias de este gen; PepF1 se codifica en plásmidos, en tanto que, PepF2, que comparte un 80% de identidad con PepF1, se codifica en el genoma. PepF también es importante durante la síntesis y degradación de proteínas bajo condiciones de restricción de nitrógeno en *L. lactis*. La α_s 1-caseína (f1–23) y/o β -caseína (f193–209) son los sustratos preferidos por las endopeptidasas de *L. lactis*, las endopeptidasas de *L. lactis* son incapaces de hidrolizar la caseína intacta (Monnet *et al.*, 1994; Nardi *et al.*, 1997; Christensen *et al.*, 1999; Savijoki *et al.*, 2006; Mayo *et al.*, 2010).

Aminopeptidasa PepC. Pertenece a la familia C1 de las cisteín peptidasas y muestra actividad en residuos: básicos, ácidos, hidrofóbicos sin carga y aromáticos. PepC muestra actividad con sustratos β -naftilamida (AA- β NAP) para residuos: básicos (Arg, His, y Lys), ácidos (Glu y Asp), hidrofóbicos sin carga (Ala y Leu), y aromáticos (Phe). PepC muestra actividad con sustratos para-nitroanilida (AA-pNA); actividad que incluye a Met- y Gly-pNA. No se detecta actividad PepC en Pro-pNA, Pro- β NAP, Xaa-Pro-pNA, o Xaa-Pro- β NAP. Se reporta actividad PepC en una variedad de di y tripéptidos con residuos básicos o sin carga en el extremo N. PepC prefiere residuos hidrofóbicos en la posición P1N (Gly-Xaa) y P2N (Gly-Gly-Xaa) (Chapot-Chartier *et al.*, 1993; Christensen *et al.*, 1999).

El análisis de varios di-, tri-, y tetrapéptidos reveló una afinidad creciente al aumentar el número de residuos. Adicionalmente, una comparación de parámetros enzimáticos medidos en sustratos de poliglicina (Gly_n, de n = 2 a n = 5) demostró dependencia de la actividad catalítica con el tamaño del sustrato. La hidrólisis y afinidad del sustrato más

alta, se observó con los péptidos: Gly-Gly-Phe-Leu y Gly-Gly-Gly-Ala. (Chapot-Chartier *et al.*, 1993; Christensen *et al.*, 1999).

Aminopeptidasa PepN. En general, la actividad de PepN en sustratos AA-pNA indica la especificidad más alta por aminoácidos básicos Lys y Arg, seguida de residuos hidrofóbicos sin carga Leu y Ala. Se observa también una actividad significativa en Met y Phe-pNA, mientras que la actividad reportada para Asp-, Glu-, and Gly-pNA es muy baja o indetectable. Se ha reportado un incremento general en la actividad a medida que aumenta la hidrofobicidad del residuo C en el dipéptido Arg-Xaa. PepN hidroliza péptidos Lys-Phe-(Gly)_n, con la actividad más alta para Lys-Phe-(Gly)₄. Varios péptidos de siete a dieciséis residuos derivados de la hidrólisis de la β -caseína con tripsina, fueron al menos parcialmente hidrolizados con PepN purificada, demostrando su capacidad de liberar residuos de sustratos más grandes (Strøman *et al.*, 1992; Tan *et al.*, 1992; Christensen *et al.*, 1999).

Aminopeptidasa PepA. Hidroliza residuos N de Glu o Asp. Hidroliza Glu- y Asp-pNA, su actividad en Glu- y Asp- β NA es baja. Hidroliza dipéptidos Glu-Xaa y Asp-Xaa cuando el residuo C es básico (-Lys), neutro (-Gly), hidrofóbico neutro (-Ala, -Leu), polar neutro (-Ser), o aromático (-Phe, -Tyr). Los dipéptidos Ser-Xaa son hidrolizados también cuando el residuo C es hidrofóbico neutro (-Ala, -Leu) o aromático (-Phe, -Tyr). PepA libera residuos ácidos de decapeptidos. No hidroliza di- y tripéptidos con otro tipo de residuo N (I'Anson *et al.*, 1995; Christensen *et al.*, 1999).

X protil dipeptidil amino peptidasa PepX. Libera 2 residuos Xaa-Pro del extremo N de péptidos. Además de su actividad peptidasa, ha catalizado reacciones amidasa y esterasa. Las actividades PepX más altas reportadas en Xaa-Pro-pNA son cuando el residuo N es neutro (Ala-, Gly-) o básico (Arg-). No hidroliza ningún dipéptido. PepX libera Xaa-Pro de sustratos de tres a siete residuos. No hay datos cinéticos reportados para comparar su actividad en relación al tamaño del sustrato. Los dipéptidos Xaa-Pro liberados contienen residuos básicos (Arg-, His-, Lys-), aromáticos (Phe-, Tyr-), e hidrofóbicos neutros (Ala-, Ile-, Val-, Gly-). Tres dipéptidos Xaa-Pro se liberan secuencialmente de la β -

casomorfina (f60-66) (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile) y de la β -caseína (f176-182) (Lys-Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln). La hidrólisis del último sustrato confirma la especificidad adicional para Xaa-Ala-(Xaa)_n identificada inicialmente con Ala-Ala-pNA. PepX también hidroliza sustratos Pro-Pro-(Xaa)_n, se observa una hidrólisis insignificante o nula con Xaa-Pro-Pro (incluso cuando Xaa es Pro). Esto se corrobora porque PepX no hidroliza bradiquinina (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) ni Lys-bradiquinina (Lys-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) (Nardi *et al.*, 1991; Christensen *et al.*, 1999).

Aminopeptidasa PepP. Se ha purificado y caracterizado tan sólo en *L. lactis*. Libera el residuo N de péptidos con especificidad general por secuencias Xaa-Pro-Pro-(Yaa)_n. La tasa de hidrólisis fue mayor para los pentapéptidos Arg-Pro-Pro-Gly-Phe (bradiquinina, f1-5) y Leu-Pro-Pro-Ser-Arg. Se observó una actividad relativamente alta con péptidos de tres a nueve residuos. No hidrolizó dipéptidos. Se observó especificidad cuando el residuo N era Arg, Met, Lys, Leu y Tyr. La hidrólisis aumentó con los derivados esterificados de Xaa-Pro-Pro-(Yaa)_n que contenían residuos Glu en las posiciones P3C y P5C (para $n = 4$) o P7C y P9C (para $n = 8$). (Matos *et al.*, 1998; Christensen *et al.*, 1999).

Tripeptidasa PepT. Hidroliza tripéptidos con una gran variedad de aminoácidos que incluyen sustratos compuestos por residuos: Hidrofóbicos neutros, aromáticos, básicos, ácidos y con azufre. Se observa hidrólisis en Pro-Gly-Gly y Leu-Xaa-Pro (-Gly- y -Ala-), pero no se observa en sustratos Xaa-Pro-Yaa. No se ha reportado que hidrolice dipéptidos, tetrapéptidos o péptidos de tamaño mayor (Mierau *et al.*, 1994; Christensen *et al.*, 1999).

Dipeptidasa PepV. Se considera una dipeptidasa de amplia especificidad. No hidroliza sustratos AA-pNA y no se ha reportado hidrólisis significativas en péptidos que contengan Pro. Hidroliza una gran variedad de dipéptidos básicos (Arg-, His- y Lys-), hidrofóbicos neutros (Ala-, Ile-, Leu- y Val-), aromáticos (Phe- y Tyr-) y residuos Met en posición N. PepV generalmente no hidroliza dipéptidos con Gly en el residuo N.

PepV hidroliza también varios sustratos β -Ala-Xaa y Xaa- β -Ala incluyendo la carnosina (β -Ala-His) (Hellendoorn *et al.*, 1997; Christensen *et al.*, 1999).

2.6. Péptidos Antihipertensivos

Para que a un péptido se le atribuya una capacidad antihipertensiva, primero debe demostrar su capacidad para inhibir a la ECA *in vitro*. Si la demuestra, posteriormente se evaluará su capacidad antihipertensiva en modelos animales. El último paso para confirmar su capacidad antihipertensiva es que se le evalúe en estudios *in vivo* con humanos (Jauhiainen *et al.*, 2007).

2.6.1. Evaluación *in vitro* de la inhibición de la ECA

La ECA es una metaloglicoproteína unida a membrana celular, con masa molecular de 150 kDa y punto isoeléctrico (pI) de 4.5. La ECA remueve 2 residuos C de la angiotensina I para producir angiotensina II. La ECA está formada de una sola cadena polipeptídica con zinc en su centro activo (imprescindible para su actividad). La ECA necesita aniones cloruro para ejercer una actividad catalítica óptima. La ECA se inhibe por la acción de: Agentes quelantes, grupos sulfhidrilo, metales pesados y ciertos péptidos (Cushman y Cheung, 1971; Martínez *et al.*, 1992).

Los métodos analíticos más usados en el campo de los alimentos son espectrofotométricos y fluorométricos. El método espectrofotométrico más usado es el propuesto por Cushman y Cheung (1971). Se basa en la cuantificación espectrofotométrica de ácido hipúrico a 228 nm. El ácido hipúrico se libera a partir de la reacción de hidrólisis enzimática donde participan la ECA y el sustrato sintético Hipuril-Histidil-Leucina.

Shalaby *et al* (2006) propusieron otro método espectrofotométrico para medir el %AIECA. Este método involucra al sustrato N-[3-(2-Furil)-acrilolil]-L-fenilalanil-glicil-glicina (FAPGG), a la ECA y a inhibidores en diferentes concentraciones. Suele usarse un fármaco inhibidor de la ECA como testigo positivo. Se monitorea la disminución de

absorbancia de las mezclas de reacción a 340 nm y 37°C. El %AIECA se calcula con los valores de absorbancia de las mezclas de reacción.

Recientemente Sentandreu y Toldrá (2006) desarrollaron un método fluorométrico que se basa en la hidrólisis del sustrato o-amino-benzoil-glicil-p-nitro-fenilalanil-prolina por la ECA. La fluorescencia de la o-amino-benzoil-glicina liberada se monitorea en un fluorímetro. La máxima actividad se detectó en un intervalo de pH de 8.0-8.5 y en un intervalo de concentración de NaCl de 0.5-0.75 M. La concentración óptima de sustrato resultó ser 0.3 mM. Se trata de un método que usa reactivos accesibles, que es simple y que puede procesar muchas muestras si se lleva a cabo en microplacas.

2.6.2. Relación estructura-función de péptidos antihipertensivos

La naturaleza de los 3 residuos C de un PAH, determinan el grado de inhibición que el péptido ejercerá sobre la ECA. La presencia de residuos hidrofóbicos: Pro, Tyr, Phe o Trp; favorecen la unión entre el PAH y el sitio activo de la ECA. La presencia de residuos básicos: Lys y Arg en el extremo C del PAH contribuye también a mejorar la inhibición. Por otra parte, la presencia de residuos: Ile o Val en la posición uno del extremo N, contribuye a mejorar la inhibición. Sin embargo, cuando un residuo: Pro, Glu o Asp ocupa la posición dos del extremo C, la actividad de inhibición disminuye o desaparece (Hernández *et al.*, 2002).

La mayoría de los PAH contienen de dos a doce residuos. Se ha demostrado en estudios cristalográficos, que al sitio activo de la ECA no se pueden unir PAH de gran tamaño. Se ha sugerido que si el residuo Leu forma parte de los tres últimos residuos del extremo C, podría aumentar la capacidad de inhibición del PAH. En el caso de los PAH con más de doce residuos, los residuos que no forman parte de los tres residuos del extremo C, podrían adoptar una estructura que permitiera al péptido unirse al sustrato. El residuo en posición P2C del PAH debe tener una configuración L para que proceda la unión con el sitio activo de la ECA. Los cambios conformacionales cis-trans del residuo Pro en la posición P1C del PAH, podrían alterar significativamente la unión entre el PAH y la ECA (Hernández *et al.*, 2010).

Quirós *et al* (2009) evaluaron el cambio en el valor de IC_{50} de LHLPLP (3.7 μ M) a medida que se reemplazaba alguno de sus residuos. Primero sintetizaron los péptidos: LHLPLL y LHLPLR, el IC_{50} de ambos fue 3.5 μ M y 1.8 μ M, respectivamente. En el primer caso, la sustitución de un residuo imino por un residuo hidrofóbico neutro, no tuvo efecto en la capacidad de inhibición del péptido. En el segundo caso, el IC_{50} fue dos veces más potente que el del PAH original. En este caso, el reemplazo del residuo imino con un residuo básico aumentó la capacidad de inhibición del péptido.

Posteriormente, se reemplazó el residuo Leu (en posición P2C) por un residuo de Ala, Gly o Tyr. Los IC_{50} de LHLPPY y LHLPGP fueron 2.3 y 1.9 μ M, respectivamente. El reemplazo de Leu por otro residuo hidrofóbico neutro (Gly) y por un residuo aromático (Tyr) mejoró la capacidad de inhibición de los péptidos. Sin embargo, al reemplazar Leu con el residuo hidrofóbico neutro (Ala) la capacidad de inhibición disminuyó. Finalmente, se sintetizaron: LHLVLP y LHLWLP, reemplazando el residuo de Pro en la posición P3C por los residuos aromáticos Tyr y Trp. Sus IC_{50} fueron de 18.9 y 9.0 μ M, respectivamente. El residuo Pro en esa posición podría ser necesario para que el PAH se una al sitio catalítico de la ECA más eficientemente (Quirós *et al.*, 2009).

Korhonen *et al* (2009), presentan estudios llevados a cabo con humanos con el propósito de correlacionar la disminución de la presión arterial con la ingesta de productos lácteos y péptidos derivados de la leche (Tabla 6). La leche fermentada Calpis®, una leche patentada en Japón, consiguió una reducción de 14.1 mm Hg ($p < 0.01$) en la presión sistólica de 30 sujetos con hipertensión en estadio I. El estudio duró 8 semanas y durante él cada paciente bebió 95 mL de leche por día lo que representó una ingesta diaria de 1.1 y 1.5 mg de los péptidos antihipertensivos IPP y VPP, respectivamente. La leche fermentada Evolus®, una leche patentada en Finlandia, consiguió una reducción de 6.7 mm Hg ($p = 0.03$) en la presión sistólica de 39 sujetos con hipertensión en estadio I. El estudio duró 21 semanas y durante él cada paciente bebió 150 mL de leche por día lo que representó una ingesta diaria de 2.25 y 3.75 mg de los péptidos antihipertensivos IPP y VPP, respectivamente. Una disminución de 5 mm Hg en la presión sistólica,

equivale a una disminución de 16%, en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (FitzGerald *et al.*, 2004).

Tabla 6. Estudios con humanos de disminución de presión arterial por ingesta de productos lácteos y péptidos de la leche

Producto	Descripción del estudio	Dosis	Duración del tratamiento en semanas	Reducción de la presión arterial sistólica	Referencia
Leche fermentada Calpis®	Ciego simple controlado con placebo a 30 sujetos con hipertensión en estadio I	95 mL día ⁻¹ (1.1 mg de IPP + 1.5 mg de VPP)	8	14.1 mm Hg (p < 0.01)	Hata et al. (1996)
	Aleatorio y doble ciego controlado con placebo a 46 hombres hipertensos	160 g día ⁻¹ (1.2 mg de IPP + 2.0 mg de VPP)	4	5.2 mm Hg (p < 0.039)	Mizushima et al. (2004)
Ameal Peptide® (Tabletas de péptidos obtenidos de la hidrólisis de la caseína)	Ciego simple controlado con placebo en 131 sujetos con prehipertensión e hipertensión en estadio I (3 grupos con dosis diferentes)	1.8 mg de IPP + VPP	6	6.3 mm Hg (p < 0.01)	Mizuno et al. (2005)
		2.5 mg de IPP + VPP		6.7 mm Hg (p < 0.001)	
		3.6 mg de IPP + VPP		10.1 mm Hg (p < 0.0001)	
Bebida de caseína hidrolizada	Doble ciego controlado con placebo en 144 sujetos con prehipertensión (PH) o hipertensión en estadio I (HI)	200 mL día ⁻¹ (1.6 mg de IPP + 1.5 mg de VPP)	12	4.6 mm Hg (grupo PH) (p < 0.001) 9.5 mm Hg (grupo HI) (p < 0.001)	Sano et al. (2005)
Tabletas pulverizadas de leche fermentada	Aleatorio y doble ciego con placebo en 80 sujetos con prehipertensión (PH) o hipertensión en estadio I (HI)	6 tabletas día ⁻¹ (Un total de 4.7 mg de IPP + 8.3 mg de VPP)	4	3.2 mm Hg (grupo PH) (p = 0.27) 11.2 mm Hg (grupo HI) (p = 0.003) Vs. placebo	Aihara et al. (2005)

® Marca con patente

Tabla 6 (continuación). Estudios con humanos de disminución de presión arterial por ingesta de productos lácteos y péptidos de la leche

Producto	Descripción del estudio	Dosis	Duración del tratamiento en semanas	Reducción de la presión arterial sistólica	Referencia
Cápsulas de leche fermentada Evolus®	Transversal y controlado con placebo en 24 sujetos con hipertensión en estadio I	4 cápsulas día ⁻¹ (3.9 mg de IPP + 3.4 mg de VPP)	1	Ninguna, sólo mejoró el flujo sanguíneo (p < 0.001)	Hirota et al. (2007)
Leche fermentada Evolus®	Aleatorio, doble ciego y controlado con placebo en 17 sujetos con hipertensión en estadio I	150 mL día ⁻¹ (2.25 mg de IPP + de 3 a 3.75 mg de VPP)	8	7.3% (p = 0.05) Vs. placebo	Seppo et al. (2002)
Leche fermentada Evolus®	Aleatorio y doble ciego controlado con placebo en 94 sujetos con hipertensión en estadio I	2 dosis de 150 mL día ⁻¹ (22.5 mg de IPP + 30 mg de VPP)	10	4.1 mm Hg (p = 0.001)	Jauhiainen et al. (2005)
Péptido C12® (un hidrolizado de proteína láctea de bovino que contiene caseína α _s 1 (f23-34) + ácido algínico)	Transversal controlado con placebo (en ciclos de 7 días) en 10 sujetos hipertensos en estadio II	100 o 200 mg de péptido C12® con 877 o 1,754 mg de ácido algínico	Una sola dosis	9 mm Hg (p = 0.02) y 6 mm Hg en presión diastólica (p = 0.015)) a las 6 h comparadas con las 2 h, a una dosis alta de ácido algínico	Townsend et al. (2004)
Leche fermentada + caseína hidrolizada + lactotripéptidos sintéticos	Aleatorio y doble ciego controlado con placebo en 135 sujetos con hipertensión en estadio I	200 mL día ⁻¹ (de 4.2 a 5.4 mg de IPP + de 5.0 a 5.8 mg de VPP en cada tratamiento)	8	No hubo diferencia significativa (P = 0.46) Vs. placebo	Engberink et al. (2008)

® Marca con patente

2.7. Actividad Peptidasa de *Lactococcus Lactis* en Leche

Meijer *et al* (1996) estudiaron la relación entre el crecimiento de dos cepas de *L. lactis* y sus actividades PrtP, PepN y PepX. Usaron las cepas *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363 y *L. lactis* subsp. *cremoris* SK1128; ambas cepas contaban con el plásmido pNZ521 que

codifica PrtP en la cepa *L. lactis* subsp. *cremoris* SK110. El crecimiento se evaluó en leche y caldo M17. En ambas cepas, la actividad PrtP se reguló por el contenido de péptidos en el medio. La actividad PrtP máxima se observó durante el crecimiento de las cepas en leche y la actividad mínima se observó durante el crecimiento de las cepas en caldo M17. La regulación de PepN y PepX dependió de la cepa evaluada. En la cepa *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363, la actividad PepN y PepX se reguló de una manera similar a la actividad PrtP. En tanto que en la cepa *L. lactis* subsp. *cremoris* SK1128, el contenido de péptidos no influyó en la actividad PepN y PepX.

Mierau *et al* (1996) examinaron la contribución de cinco peptidasas al crecimiento de *L. lactis* en leche. Se construyeron 16 cepas mutantes que carecían de una a cinco peptidasas (PepO, PepC, PepN, PepX y PepT). La tasa de crecimiento de cepas mutantes de dos o más peptidasas disminuyó. Se observó una tendencia general; a medida que se eliminaban peptidasas, la tasa de crecimiento de *L. lactis* disminuía. La cepa mutante de cinco peptidasas creció diez veces más lentamente que la cepa nativa. En la cepa mutante de cinco peptidasas y en una cepa mutante de cuatro peptidasas; el contenido intracelular de aminoácidos fue menor al encontrado en la cepa nativa. Adicionalmente, se encontraron péptidos acumulados en el citoplasma de las cepas mutantes. No se observó diferencia significativa en la actividad de PrtP y Opp. Tampoco se afectó la expresión de las peptidasas Aún presentes. Por lo tanto, los autores concluyeron que la disminución de la tasa de crecimiento se atribuyó a la incapacidad de las cepas mutantes de degradar los péptidos obtenidos a partir de la caseína.

Meijer *et al* (1997) relacionaron el crecimiento de *L. lactis* ssp. *lactis* MG1363, con sus actividades PrtP, PepN y PepX (usando diferentes tipos de leche). La actividad de las tres enzimas de las células que crecieron en leche tratada a altas temperaturas, fue menor que la actividad de las células que crecieron en leche sin ningún tratamiento. La actividad máxima de las tres enzimas se presentó cuando las células crecieron en leche pasteurizada (63°C durante 30 min). Cuando se precipitaron las caseínas de la leche tratada a altas temperaturas (a pH de 4.6), y se cuantificaron los péptidos del sobrenadante por RP-HPLC; se encontró que los péptidos pequeños e hidrofílicos eran

responsables de regular a PrtP; ya que no se encontraron aminoácidos en el sobrenadante. La leche ultrafiltrada disminuyó las actividades PrtP y PepN; por el aumento de materia seca. La actividad máxima de las tres enzimas se detectó cuando *L. lactis* creció en leche sin concentrar y la actividad mínima se detectó cuando creció en leche concentrada cuatro veces. Se demostró que un 40% de disminución en actividad PrtP y PepN, se explicaba por el aumento en el contenido de péptidos o de materia seca en la leche.

Helinck *et al* (1997) obtuvieron las proteasas purificadas de seis cepas de *L. lactis* y determinaron la actividad de cada proteasa con el sustrato cromogénico MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA. Luego inocularon cada cepa individualmente en leche y a cada cepa se le agregó su propia proteasa. Al principio de la fermentación, se observó un gran incremento de la tasa de crecimiento, sin importar el tipo de proteasa o cepa usados. Esto demostró, que al aumentar la tasa de degradación de las proteínas lácteas, aumentaba también la tasa de crecimiento de *L. lactis* en leche. Sin embargo, el aumento en la tasa de crecimiento fue pasajero y la reducción subsecuente de la tasa de crecimiento si dependió del tipo de proteasa agregada. Cuando se agregó una proteasa PI, tres causas estuvieron involucradas en la reducción de la tasa de crecimiento: a) la degradación de la proteasa agregada, b) la represión de la actividad proteolítica expresada por las células y c) la competencia entre las dos proteasas por la captación de péptidos. Cuando se agregó una proteasa PIII, la disminución de la tasa de crecimiento se debió sólo a la autoproteólisis de la enzima agregada.

Algaron *et al* (2004) fermentaron leche con cinco cepas de *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, una cepa nativa y cuatro cepas mutantes. A tres cepas mutantes se les inactivó el gen que codificaba las peptidasas PepT, PepN y PepX, respectivamente. A la cuarta cepa mutante se le inactivaron simultáneamente las peptidasas PepT y PepN. Se encontró que los péptidos inhibidores de la ECA obtenidos con las cepas mutantes tuvieron un %AIECA significativamente mayor al mostrado por la cepa nativa, evidenciando que para esas condiciones experimentales en particular, la ausencia de la actividad peptidasa evitó la degradación de péptidos inhibidores de la ECA ya formados.

Por lo que, las cepas mutantes deficientes en estas actividades peptidasas, podrían ser mejores productoras de PAH. Los autores recomiendan buscar cepas nativas con estas características.

Kilpi *et al* (2007) monitorearon el %AIECA en leche fermentada durante 150 h por tres cepas de *Lactobacillus helveticus*; una cepa de colección y dos cepas mutantes sin las peptidasas PepN y PepX, respectivamente. El %AIECA de la cepa de colección se mantuvo constante y en las cepas mutantes subió gradualmente durante las primeras 90 h. De las 90 a las 150 h el %AIECA de la cepa de colección subió gradualmente, el de la cepa mutante PepX siguió subiendo y el de la cepa mutante PepN bajó gradualmente. Al final de la fermentación el %AIECA de las cepas mutantes fue mayor que el de la cepa nativa. De nuevo, cepas mutantes deficientes en actividad PepN o PepX, fueron mejores productoras de PAH, lo que constituyó un precedente para la búsqueda de cepas nativas con estas características.

HIPÓTESIS

La capacidad inhibidora de la actividad de ECA en leches fermentadas por *Lactococcus lactis* está determinada por la actividad de peptidasas específicas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar las actividades de peptidasas específicas de cepas de *Lactococcus lactis* y su relación con la capacidad inhibidora de la actividad de ECA en leches fermentadas.

Objetivos Específicos

Evaluar las actividades de peptidasas específicas en las cepas bajo estudio.

Relacionar las actividades de peptidasas específicas de las cepas de *Lactococcus lactis* con su capacidad inhibidora de la actividad de ECA para identificar cuáles actividades enzimáticas son determinantes de la inhibición.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Sustratos, Reactivos y Materiales

El caldo M17 y la lactosa se obtuvieron de Becton Dickinson Difco (Sparks, MD), la leche en polvo desnatada grado orgánico USDA A se obtuvo de Organic Valley (La Farge, WI), las microplacas plásticas y estériles de 96 pocillos se obtuvieron de Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ), el metoxi-succinil-arginil-prolil-tirosil-para-nitroanilida (MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA) se obtuvo de DiaPharma Group Inc. (West Chester, OH), las microesferas de borosilicato de 0.1 mm de diámetro y los viales plásticos de 2 mL con tapa con rosca para micro centrifuga se obtuvieron de BioSpec Products Inc. (Bartlesville, OK), el reactivo de Bradford y las diluciones de albúmina sérica bovina (ASB) se obtuvieron de Bio Rad Laboratories INC. (Hércules, CA), la membrana de exclusión de 3 kDa se obtuvo de Pall Life Science (Ann Arbor, MI).

Todos los sustratos y reactivos empleados se obtuvieron de Sigma (Chemical Co., St. Louis, MO). Cloruro de sodio, cloruro de calcio, hidróxido de sodio, citrato trisódico dihidratado, metaborato de sodio tetrahidratado, ácido acético, ácido clorhídrico, metanol, acetato de etilo, aceite mineral grado biología molecular, hipuril-histidil-leucina (HHL), ECA de pulmón de conejo, para-nitroanilina en polvo (pNA), L-glutamil-1-(4-nitroanilida) o Glu-pNA, dihidrobromuro de L-lisil-para-nitroanilida o Lys-pNA, trifluoracetato de L-prolil-para-nitroanilida o Pro-pNA, hidrocloreuro de glicil-prolil-para-nitroanilida o Gly-Pro-pNA, ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il] etano sulfónico o HEPES, ácido 2-(N-morfolin) etano sulfónico o MES, 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol o TRIS y ácido 2-({2-[bis (carboximetil) amino] etil} (carboximetil) amino) acético o EDTA.

3.2. Cepas de *Lactococcus lactis*

Las cepas se obtuvieron de la colección de bacterias ácido lácticas del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) (Hermosillo, Sonora, México). Las cepas de *Lactococcus lactis* fueron previamente aisladas de productos lácteos artesanales (Q1, Q2, Q3, R1 y R7) de cultivos iniciadores comerciales (C1, E1, E3, P2, K1, K3, K5, Z1 y Z2) y de vegetales (B7, J6, M1, M5 y M7) (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2008). Adicionalmente, se evaluó una cepa ATCC de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 19257 (LLC).

3.3. Reactivación y Propagación de Cepas en Caldo M17

A menos que se indique otra condición, todo medio y material se esterilizó a 121 °C y 15 PSI durante 15 min, en una autoclave modelo SM510 (Yamato Scientific Co., LTD). Toda incubación se llevó a cabo en una incubadora Thermo Scientific Precision. Cada cepa de *L. lactis* se inoculó individualmente en 10 mL de caldo M17 estéril (1% v/v) suplementado previamente con lactosa (0.5% p/v) y se incubó 24 h a 30 °C. Posteriormente, con el fin de obtener cultivos frescos, cada cepa se propagó 2 veces de acuerdo a lo descrito por Rodríguez-Figueroa *et al.* (2010).

3.4. Preparación, Inoculación y Fermentación de Leches

Se reconstituyó la leche en polvo con agua destilada (10%, p/v) y se esterilizó a 110 °C y 7 PSI durante 10 min. Para cada cepa se preparó 1 preinóculo como se describe a continuación. Una alícuota (1 %, v/v) de los cultivos frescos que se encontraban al final de su fase exponencial de crecimiento fueron inoculados en 35 mL de leche estéril. La leche inoculada se incubó a 30°C durante 12 h. Posteriormente, una alícuota (3%, v/v) de este preinóculo se adicionó a 70 mL de leche. La leche se incubó a 30°C durante 12 h. Una vez transcurrido el tiempo de fermentación, se midió el pH de la leche fermentada (potenciómetro modelo pH 211, Hanna Instruments; Woonsocket, RI), se le

dio un tratamiento térmico de 75°C durante 1 min para inactivar la cepa y se congeló a -20°C para analizar posteriormente el IC₅₀, (Muguerza *et al.*, 2006; Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2010). De forma paralela, otra muestra de 300 mL de leche fue fermentada y se usó para obtener el contenido intracelular de las cepas bacterianas y el sobrenadante de la leche fermentada.

3.5. Obtención de Sobrenadante, Células Íntegras y Contenido Intracelular

3.5.1. Obtención de sobrenadante de leches fermentadas

Por cada cepa evaluada, se tomaron 35 mL de la leche fermentada y se depositaron en tubos Falcon (6 tubos en total), se centrifugaron a 4,500 \times g, y 4 °C durante 20 min (centrífuga Thermo Fisher Scientific Sorvale ST16R) (Pan *et al.*, 2010). El sobrenadante se pasó a 2 tubos Falcon nuevos, donde se ajustó el pH a 6.5 y se agregaron 4.2 mL de una solución acuosa de citrato trisódico dihidratado (15% p/v), hasta una concentración final de citrato del 1% (p/v). Los 2 tubos con sobrenadante se mantuvieron en hielo durante 15 min para su clarificación (Mierau *et al.*, 1996).

3.5.2. Obtención de la suspensión de células íntegras de las cepas bajo estudio

A 2 tubos Falcon con el paquete celular de la centrifugación anterior, se les agregaron 5 mL de solución amortiguadora TRIS 100 mM (pH de 6.5), a la que previamente se le había agregado citrato trisódico dihidratado, a una concentración final del 1% (p/v). Se centrifugaron a 4,500 \times g y 4 °C durante 20 min y el sobrenadante se descartó. El procedimiento se repitió 2 veces para remover los residuos de leche del paquete celular (Mierau *et al.*, 1996). Enseguida, a los 2 tubos con el paquete celular de la centrifugación anterior, se les agregaron 5 mL de solución amortiguadora TRIS 80 mM (pH de 7.0). Se centrifugaron a 4,500 \times g y 4 °C durante 20 min y el sobrenadante se descartó. El procedimiento se repitió 2 veces, para remover impurezas del paquete celular (Mierau *et al.*, 1996). Finalmente, se agregó solución amortiguadora TRIS 80 mM (pH de 7.0) al paquete celular, hasta obtener una suspensión celular con una densidad óptica de 0.2 a 600 nm (lector de microplacas Opsys, Dynex, OR., USA) (Mierau *et al.*, 1996).

3.5.3 Obtención del contenido intracelular de las cepas bajo estudio

A los otros 4 tubos Falcon con el paquete celular, se les agregaron 5 mL de solución amortiguadora TRIS 100 mM (pH de 6.5), a la que previamente se le había agregado citrato trisódico dihidratado, a una concentración final del 1% (p/v). Se centrifugaron a $4,500 \times g$ y 4°C durante 20 min y el sobrenadante se descartó. El procedimiento se repitió 2 veces para remover los residuos de leche del paquete celular (Mierau *et al.*, 1996). Enseguida, a los 4 tubos con el paquete celular de la centrifugación anterior, se les agregaron 5 mL de solución amortiguadora HEPES 50 mM (pH de 7.0). Se centrifugaron a $4,500 \times g$ y 4°C durante 20 min y el sobrenadante se descartó. El procedimiento se repitió 2 veces, para remover impurezas del paquete celular (Mierau *et al.*, 1996). Posteriormente, se agregó solución amortiguadora HEPES 50 mM (pH de 7.0) al paquete celular, hasta obtener una suspensión celular con una densidad óptica de 0.7 a 600 nm (Mierau *et al.*, 1996). Más adelante, se vaciaron microesferas de borosilicato en los viales apropiados, hasta ocupar aproximadamente la mitad del vial y el vial se llenó completamente con la suspensión celular preparada con anterioridad. Los viales se acomodaron en el equipo de ruptura mecánica de células conocido como Mini Bead Beater 16 (BioSpec Products Inc., Bartlesville, OK). Se aplicaron 3 ciclos de 1 min cada uno. Entre cada ciclo los viales se enfriaron en hielo durante 1 min (Tuler *et al.*, 2002; Christensen *et al.*, 2003). Finalmente, los viales se centrifugaron a $20,000 \times g$ y 4°C durante 20 min (micro centrífuga Eppendorff modelo 5417R). El precipitado se descartó y al sobrenadante se le consideró el contenido intracelular de cada cepa. (Thomas *et al.*, 2010).

3.6. Medición de Actividad Proteasa en Células Íntegras

En el pocillo de una microplaca, se vaciaron 175 μL de la suspensión de células íntegras y 25 μL de MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA (2 mM). La mezcla de reacción se cubrió con 50 μL de aceite mineral. Se midió la absorbancia inicial (a las 0 h) y la absorbancia final (a las 3 h) de la mezcla de reacción, en un lector de microplacas ELISA a 405 nm, para obtener el cambio de absorbancia por minuto (Mierau *et al.*, 1996).

3.7. Medición de Actividad Peptidasa de Contenido Intracelular

Se preparó cada mezcla de reacción en un tubo de ensayo. El blanco se preparó en otro tubo de ensayo y el volumen de la muestra se reemplazó con la solución amortiguadora correspondiente. Cada mezcla de reacción incluyó: a) solución amortiguadora, b) sustrato cromogénico y c) contenido intracelular. En la tabla 7 se presenta el resumen de los componentes de la mezcla de reacción y las cantidades empleadas.

Tabla 7. Mezclas de reacción para la determinación de actividades peptidasa

Actividad peptidasa	Solución amortiguadora	Sustrato cromogénico (16.4 mM) ¹	Contenido intracelular	EDTA ² 37.5 mM
PepA	1,300 µL de HEPES 50 mM a pH de 8.0	150 µL de Glu-pNA	50 µL	0 µL
PepC	1,200 µL de HEPES 50 mM a pH de 7.0	50 µL de Lys-pNA	50 µL	200 µL
PepI	1,400 µL de HEPES 50 mM a pH de 7.5	50 µL de Pro-pNA	50 µL	0 µL
PepN	1,400 µL de HEPES 50 mM a pH de 7.0	50 µL de Lys-pNA	50 µL	0 µL
PepX	1,400 µL de MES 50 mM a pH de 6.5	50 µL de Gly-Pro-pNA	50 µL	0 µL

¹El Soda y Desmazeud, (1982).

²Niven *et al.*, (1991)

Las mezclas de reacción se incubaron a 37 °C durante 1 h (PepA, PepC, PepN y PepX) o durante 6 h (PepI). La reacción se detuvo agregando a cada mezcla de reacción 250 µL de ácido acético al 30% (v/v). Posteriormente, se ajustó a cero el espectrofotómetro con el blanco adecuado. Finalmente, se midió la absorbancia de 6 µL de cada mezcla de

reacción a 410 nm, para obtener el cambio de absorbancia por minuto. (Espectrofotómetro modelo NanoDrop 2000C; Thermo Scientific) (El Soda *et al.*, 1982).

3.8. Medición de Actividad Peptidasa en Sobrenadante de Leche Fermentada

Se midió igual que en el contenido intracelular con algunas modificaciones. La reacción no se detuvo con ácido acético (30% v/v), ya que en estudios preliminares, se observó que se formaba una turbidez que impedía medir la absorbancia del blanco y de la muestra. La mezcla de reacción y el recipiente que contenía la solución amortiguadora correspondiente, se incubaron a 37°C durante *ca.* 60 min (PepA, PepC, PepN y PepX) o durante *ca.* 360 min (PepI). Se preparó el blanco usando la solución amortiguadora incubada a 37°C y se ajustó a cero el espectrofotómetro. Se midió la absorbancia de cada mezcla de reacción a 410 nm y se tomó el número de minutos totales para obtener el cambio de absorbancia por minuto.

3.9. Curvas de Calibración de Para-Nitroanilina

Para cuantificar los nanomoles de pNA liberados durante la actividad PrtP, se obtuvo una curva de pNA *vs.* absorbancia a 405 nm, disolviendo pNA sólida en solución amortiguadora TRIS 80 mM (pH 7.0), a las diluciones adecuadas. Para cuantificar los nanomoles de pNA liberados durante la actividad PepX, se obtuvo una curva de pNA *vs.* absorbancia a 410 nm, disolviendo pNA sólida en solución amortiguadora MES 50 mM (pH 6.5), a las diluciones adecuadas. Para cuantificar los nanomoles de pNA liberados durante el resto de las actividades peptidasa, se obtuvo una curva de pNA *vs.* absorbancia a 410 nm, disolviendo pNA sólida en solución amortiguadora HEPES 50 mM (pH 7.0), a las diluciones adecuadas.

3.10. Obtención del Conjunto de Péptidos Menor de 3 kDa

Se descongeló la leche fermentada cuyas células se habían inactivado previamente; y se centrifugó a 5,000 *RPM* y 4°C durante 30 min, para remover las células inactivas. Se

descartó el precipitado y el sobrenadante se ultrafiltró usando una membrana de exclusión de 3 kDa. El ultrafiltrado se liofilizó para su uso posterior.

3.11. Medición del %AIECA

Se preparó una solución del sustrato de la ECA que contenía: HLL (5 mM), metaborato de sodio tetrahidratado (100 mM) y NaCl (300 mM); el pH del sustrato se ajustó a 8.3. El liofilizado obtenido con anterioridad se diluyó en agua milli-Q a una concentración final de 200 mg mL⁻¹ (extracto acuoso < 3 kDa). De esta fracción se hicieron 2 diluciones, una al 90% y otra al 80%. Cada mezcla de reacción se llevó a cabo en un vial de 2 mL (Tabla 8).

Tabla 8. Mezclas de reacción para determinar el %AIECA

Mezcla	Sustrato (μL)	Agua milli-Q (μL)	Extracto acuoso < 3 kDa ¹ (μL)	ECA a 0.1 U (μL)
A	100	0	40	20
B	100	20	40	0
C	100	40	0	20
D	100	60	0	0

¹Obtenido al reconstituir el liofilizado a 200 mg mL⁻¹

Para cada cepa se usaron 30 viales: 6 para el testigo positivo (mezcla C) y 6 para el testigo negativo (mezcla D). En el caso de la mezcla B, se usaron 6 viales: 2 del extracto acuoso < 3 kDa, 2 de la dilución al 90% y 2 de la dilución al 80%. En el caso de la mezcla A, se usaron 12 viales: 4 del extracto acuoso < 3 kDa, 4 de la dilución al 90% y 4 de la dilución al 80%.

Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante 30 min. La reacción se detuvo agregando 250 μL de HCl 1M. Se agregó 1 mL de acetato de etilo a cada vial y se homogeneizó para extraer el ácido hipúrico liberado. Los viales se centrifugaron a 1,500

x g durante 10 min, se pasaron 750 μ L del sobrenadante a viales nuevos y el acetato de etilo se evaporó en un rotavapor a 75°C durante 20 min. Se agregó a cada vial 1 mL de agua milliQ y se homogeneizó para disolver el residuo de ácido hipúrico. Se midió la absorbancia de 6 μ L de cada vial en un espectrofotómetro a 228 nm. Se obtuvo el promedio de absorbancia de cada tipo de mezcla de reacción y para cada cepa se calculó el %AIECA con la siguiente fórmula: %AIECA = $[1 - [(A-B) / (C - D)]] * 100$ (Cushman y Cheung, 1971; Donkor *et al.*, 2007).

3.12. Cuantificación de Proteína

Para cuantificar la proteína de la suspensión de células íntegras, del contenido intracelular y del extracto acuoso < 3 kDa (y sus diluciones al 90 y 80%), se usó el método de Bradford (1976). Usando la albúmina sérica bovina como proteína estándar, se elaboraron 8 curvas de calibración, cuatro para concentraciones de proteína de 0 a 125 μ g mL⁻¹ y 4 para concentraciones de proteína de 125 a 1,000 μ g mL⁻¹. Las 4 curvas dentro de cada categoría representan los 4 solventes que se emplearon: Agua milli-Q (%AIECA), TRIS 80 mM pH 7.0 (PrtP), HEPES 50 mM pH 7.0 (PepA, PepC, PepI, PepN) y MES 50 mM pH 6.5 (PepX).

3.13. Determinación de IC₅₀

Para determinar el IC₅₀ de cada cepa, se usaron los 3 valores del %AIECA (del extracto acuoso < 3 kDa y de sus diluciones al 90 y 80%) en el eje de las abscisas y los valores de su contenido de proteína en el eje de las ordenadas. Usando una ecuación específica para cada cepa obtenida a partir de un modelo de regresión lineal simple, se calculó el valor de “y” cuando se le asignaba un valor de 50 a “x”. Este valor de “y” es el IC₅₀ de cada cepa.

3.14. Análisis Estadístico

Para determinar cuál o cuáles actividades enzimáticas son determinantes en la obtención de valores bajos de IC_{50} , se usó un modelo de regresión lineal múltiple donde se consideró a los valores de IC_{50} como la variable dependiente y a los valores de actividades enzimáticas y capacidad acidificante como las variables independientes. Las variables independientes se transformaron con una raíz cuadrada. Por otro lado, a la variable dependiente no se le aplicó transformación alguna (Hintze, J., 2007).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra los valores de pH de leche fermentada por catorce cepas de *L. lactis* durante 12 h. Los valores están dentro de un intervalo que va de 4.72 a 6.54. Además se evaluaron seis cepas adicionales, que por su gran capacidad productora de ácido láctico, coagularon la leche antes de las 12 h, por lo que la fermentación fue interrumpida a diferentes tiempos, a las 5 h para E3 y LLC, a las 6h para R7 y Z1, a las 9.5 h para Q2 y a las 10 h para Q1. La fermentación fue interrumpida cuando el pH de la leche se encontraba dentro de un intervalo de 5.0 a 5.5 para evitar el punto isoeléctrico de la caseína ($pI = 4.6$). En este trabajo se obtuvieron valores de pH similares al intervalo de valores de pH (4.44-6.20) reportado por González *et al* (2010), al fermentar leche con trece cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* durante 12 h.

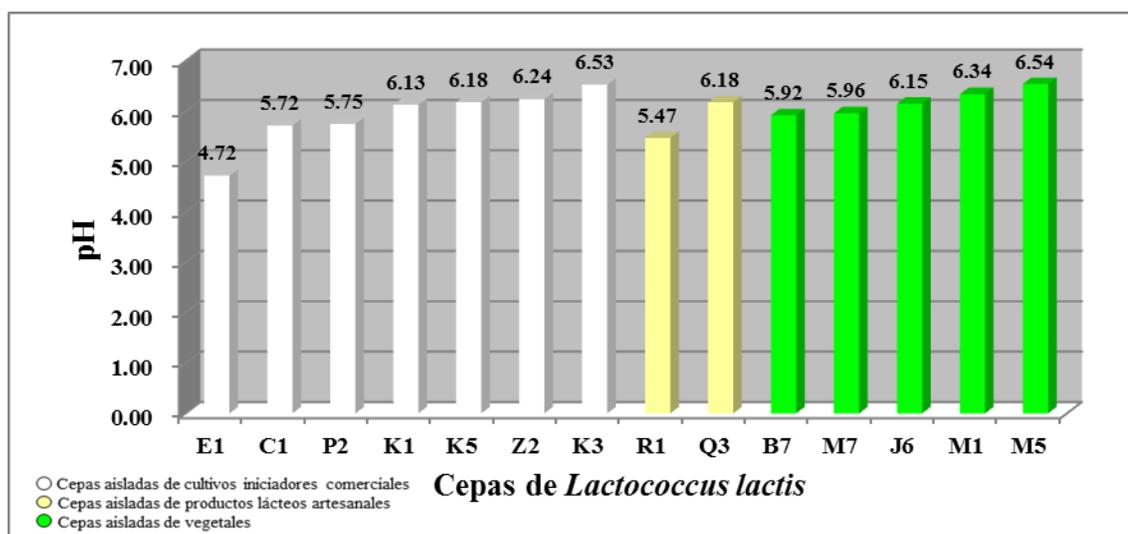


Figura 1. pH de leche fermentada por cepas de *L. lactis* durante 12 h

La figura 2 muestra los valores de capacidad acidificante de las cepas que fermentaron leche durante 12 h. Los valores están dentro de un intervalo que va de 0.79 a 15.71. Por otro lado, las seis cepas adicionales presentaron una gran capacidad acidificante de 12.70, 19.63, 20.96, 23.08, 23.55 y 25.75 para Q1, Q2, Z1, R7, LLC y E3, respectivamente. Server *et al* (1998) obtuvieron un intervalo de capacidad acidificante

que iba de tres a cincuenta y uno, después de evaluar veintiún cepas de *L. lactis*. Los valores obtenidos en el presente estudio están dentro de tal intervalo.

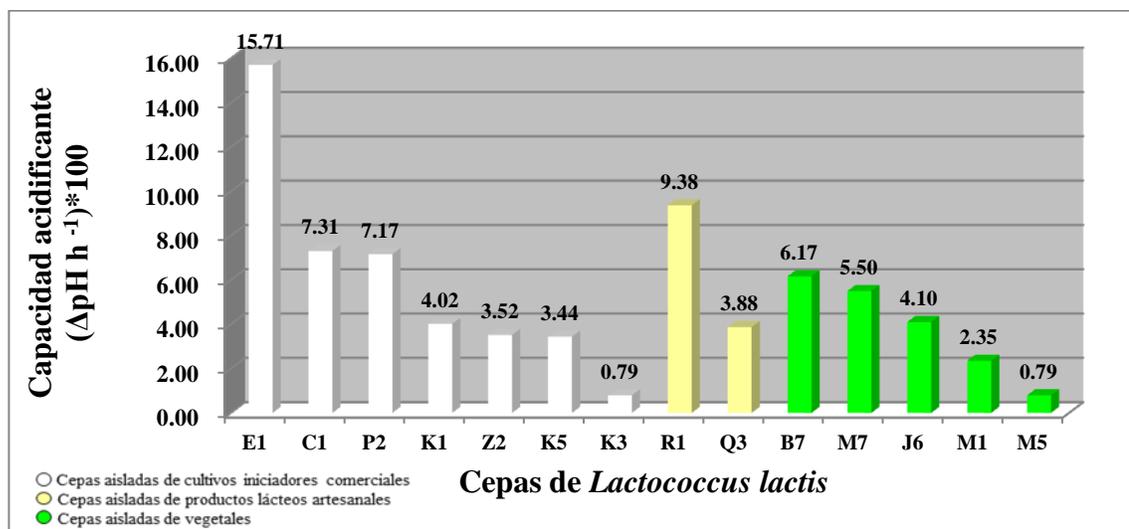


Figura 2. Capacidad acidificante de cepas de *L. lactis* que fermentaron leche durante 12 h

La disminución del pH y la capacidad acidificante de la leche fermentada se debe a la producción de ácido láctico como resultado del metabolismo de la glucosa. Una cepa con un metabolismo glicolítico alto es deseable para incluirla en un cultivo iniciador comercial, porque imparte atributos únicos de sabor y aroma al producto lácteo fermentado (Van *et al.*, 2007). Por lo que, desde el punto de vista tecnológico, las seis cepas con una gran capacidad acidificante, que coagularon a la leche < 12 h, serían buenas candidatas para ser incluidas en un cultivo iniciador.

La figura 3 y la tabla 9 muestran los valores de IC₅₀ y %AIECA de los extractos acuosos < 3 kDa obtenidos de las leches fermentadas por 12 h. El IC₅₀ se define como la concentración necesaria de un compuesto para inhibir en un 50% la conversión de angiotensina I a angiotensina II, por lo que este valor debe ser lo más bajo posible. Los valores de IC₅₀ más bajos obtenidos en este estudio fueron: 23, 34 y 53 μg mL⁻¹ para las cepas: C1, E1, y M1, respectivamente. Por otro lado, las seis cepas adicionales,

presentaron valores de IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de 17, 64, 88, 118, 349 y 508 para R7, LLC, Q2, Q1, Z1 y E3, respectivamente.

Rodríguez-Figueroa *et al* (2010) fermentaron leche con las mismas cepas en una fermentación que duró 48 h. Los valores de IC_{50} más bajos obtenidos de cepas nativas fueron: 13, 20 y $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ para las cepas: Q2, Q1 y R7, respectivamente. Como se puede observar, la cepa R7 es una de las mejores en ambos estudios ya que presentó un IC_{50} menor a $25 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para el caso de Q2 y Q1, el IC_{50} fue significativamente menor cuando la fermentación se prolongó hasta las 48 h. Por el contrario, para R7, el IC_{50} no cambió significativamente cuando la fermentación se prolongó de 6 a 48 h. Por lo anterior, los valores de IC_{50} no disminuyen necesariamente al aumentar el tiempo de fermentación (hidrólisis).

En las tablas 10 y 11 se muestran los valores de actividad proteasa (PrtP) de células íntegras y los valores de actividad peptidasa (PepA, PepC, PepI, PepN y PepX) del contenido intracelular de las cepas bajo estudio. La actividad PrtP de las cepas B7, M5, M7, R1 y P2 fue cero. La actividad PrtP de las cepas K5, Q3, K1, K3, J6 y M1 fue 1.43, 2.43, 4.27, 4.36, 4.46 y 4.53, respectivamente. La actividad PrtP de las cepas C1, Z2 y E1 fue 14.13, 15.79 y 18.56 nanomoles de pNA min^{-1} mg de proteína $^{-1}$, respectivamente. En relación a las 5 cepas con actividad PrtP de cero, se sabe que existen cepas de *L. lactis* proteasa-negativas que no tienen el gen que codifica la proteasa extracelular, sin embargo, si cuentan con sistemas de transporte y peptidasas intracelulares. Estas cepas crecen en leche porque aprovechan los péptidos y aminoácidos presentes en la leche de manera natural y dejan de crecer en cuanto estos péptidos y aminoácidos se agotan (Juillard *et al.*, 1996). En relación al siguiente grupo de cepas de este estudio (K5, Q3, K1, K3, J6 y M1), se observaron valores de actividad PrtP semejantes a los reportados por Mierau *et al* (1996) en trece cepas de *L. lactis*. Las tres cepas (C1, E1 y Z2) con los valores más altos de actividad PrtP se aislaron de cultivos iniciadores comerciales. Este tipo de cepas han sido propagadas en leche que es un sustrato rico en proteínas, lo cual estimula una gran actividad catalítica de sus proteasas y les permite crecer más rápidamente (Wouters *et al.*, 2002; Teuber *et al.*, 2006).

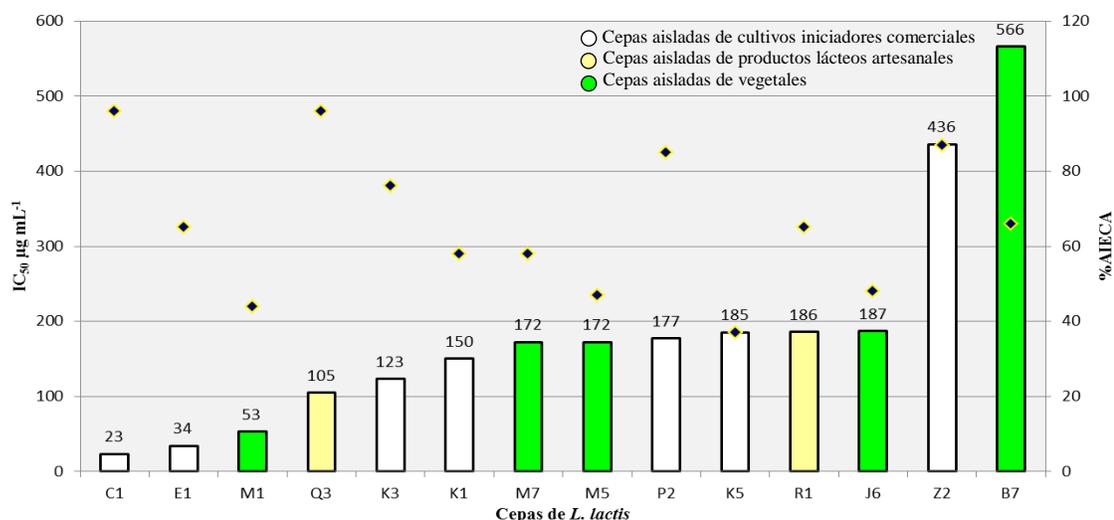


Figura 3. Valores de IC₅₀ (barras) y %AIECA (rombos) del extracto acuoso < 3 kDa obtenido de las leches fermentadas con cepas de *L. lactis* durante 12 h

Tabla 9. Valores de IC₅₀ y %AIECA del extracto acuoso < 3 kDa de leches fermentadas con cepas de *L. lactis* (< 12 h)

Cepa	%AIECA ¹	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)
R7	87 ± 3.3	17
LLC ²	93 ± 5.0	64
Q2	62 ± 4.4	88
Q1	53 ± 0.8	118
Z1	63 ± 8.7	349
E3	35 ± 3.0	508

¹ Promedio ± desviación estándar de duplicado

² Cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. ATCC 19257

Los valores de actividad PepA para las cepas bajo estudio, se distribuyen en dos grupos. El primer grupo incluye cinco cepas con valores comprendidos entre 0 y 9.81, en tanto que el segundo grupo incluye nueve cepas con valores comprendidos entre 42.62 y 93.62

nanomoles de pNA min⁻¹ mg de proteína⁻¹. Van *et al* (2007) determinaron actividad PepA en una colección de ochenta y nueve cepas de *L. lactis* (cuarenta y seis cepas de *L.*

Tabla 10. Valores de actividad proteasa y peptidasa de cepas de *L. lactis* que fermentaron leche durante 12 h

Cepa	Actividad PrtP ¹	Actividad PepA ¹	Actividad PepC ¹	Actividad PepI ¹	Actividad PepN ¹	Actividad PepX ¹
C1	14.13 ± 0.893	2.80 ± 0.234	3.13 ± 0.234	0.41 ± 0.039	17.70 ± 0.234	44.26 ± 0.857
E1	18.56 ± 1.144	92.64 ± 6.76	23.79 ± 1.35	ND ²	14.22 ± 1.35	271.87 ± 13.36
M1	4.53 ± 0.317	ND ²	40.23 ± 1.304	ND ²	57.44 ± 2.173	105.12 ± 7.963
Q3	2.43 ± 0.308	52.04 ± 4.948	ND ²	ND ²	ND ²	ND ²
K3	4.36 ± 0.202	88.94 ± 8.456	ND ²	ND ²	112.86 ± 8.456	82.95 ± 2.725
K1	4.27 ± 0.297	71.37 ± 5.981	62.91 ± 5.981	ND ²	79.83 ± 5.981	141.33 ± 4.638
M7	ND ²	42.62 ± 3.559	ND ²	ND ²	31.30 ± 1.779	20.07 ± 1.880
M5	ND ²	59.73 ± 2.736	28.78 ± 2.736	ND ²	36.52 ± 2.736	28.51 ± 2.671
P2	ND ²	3.25 ± 0.309	13.31 ± 0.309	ND ²	30.15 ± 1.855	29.14 ± 2.995
K5	1.43 ± 0.197	69.41 ± 6.599	ND ²	ND ²	78.74 ± 6.599	136.13 ± 4.924
R1	ND ²	1.59 ± 0.108	10.36 ± 1.079	ND ²	ND ²	ND ²
J6	4.46 ± 0.288	56.51 ± 4.216	35.65 ± 2.811	ND ²	116.14 ± 9.837	130.32 ± 12.277
Z2	15.79 ± 0.238	93.62 ± 8.900	ND ²	ND ²	106.20 ± 8.900	154.85 ± 1.449
B7	ND ²	9.81 ± 0.933	ND ²	ND ²	32.25 ± 2.799	11.36 ± 1.064

¹ Valores expresados en nanomoles de pNA min⁻¹ mg de proteína⁻¹. Promedio ± desviación estándar de duplicado

² No detectada

lactis subsp. *cremoris*, veintidós cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* de origen lácteo y veintiún cepas nativas de *L. lactis* subsp. *lactis*) que crecieron en caldo M17 suplementado con lactosa. Los valores que obtuvieron oscilaron entre cero y diez nanomoles de pNA min⁻¹ mg de proteína⁻¹. Estos valores son semejantes a los encontrados en el primer grupo de cepas de este estudio. Por otro lado, el segundo grupo de cepas de este estudio presentó una alta actividad PepA en leche. Debido a que PepA remueve residuos de ácido glutámico del extremo amino terminal de los péptidos y que el ácido glutámico es el segundo aminoácido más abundante en la leche (Fennema *et al.*,

2007), se podría hipotetizar que la enzima expresada en leche, tendría una actividad catalítica mayor para aprovechar tal aminoácido.

Tabla 11. Valores de actividad proteasa y peptidasa de cepas de *L. lactis* que fermentaron leche (< 12 h)

Cepa	Actividad PrtP ¹	Actividad PepA ¹	Actividad PepC ¹	Actividad PepI ¹	Actividad PepN ¹	Actividad PepX ¹
R7	1.28 ± 0.051	ND ²	ND ²	ND ²	97.34 ± 9.254	189.52 ± 5.943
LLC	16.92 ± 1.061	7.28 ± 0.692	21.95 ± 2.075	ND ²	12.17 ± 0.692	17.74 ± 0.807
Q2	11.72 ± 0.171	ND ²	25.72 ± 1.302	1.14 ± 0.109	40.91 ± 0.651	237.76 ± 16.008
Q1	11.57 ± 1.076	58.31 ± 2.661	ND ²	ND ²	32.50 ± 2.661	228.19 ± 1.828
Z1	4.57 ± 0.404	2.45 ± 0.205	21.32 ± 1.437	0.36 ± 0.034	7.39 ± 0.616	5.52 ± 0.251
E3	16.78 ± 0.558	ND ²	10.21 ± 0.692	ND ²	11.19 ± 0.692	39.42 ± 0.807

¹ Valores expresados en nanomoles de pNA min⁻¹ mg de proteína⁻¹. Promedio ± desviación estándar de duplicado

² No detectada

Los valores de actividad PepA para las cepas bajo estudio, se distribuyen en 2 grupos. El primer grupo incluye 5 cepas con valores comprendidos entre 0 y 9.81, en tanto que el segundo grupo incluye 9 cepas con valores comprendidos entre 42.62 y 93.62 nanomoles de pNA min⁻¹ mg de proteína⁻¹. Van *et al* (2007), determinaron actividad PepA en una colección de 89 cepas de *L. lactis* (46 cepas de *L. lactis* subsp. *cremoris*, 22 cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* de origen lácteo y 21 cepas nativas de *L. lactis* subsp. *lactis*) que crecieron en caldo M17 suplementado con lactosa. Los valores que obtuvieron oscilaron entre 0 y 10 nanomoles de pNA min⁻¹ mg de proteína⁻¹. Estos valores son semejantes a los encontrados en el primer grupo de cepas de este estudio. Por otro lado, el segundo grupo de cepas de este estudio presentó una alta actividad PepA en leche. Debido a que PepA remueve residuos de ácido glutámico del extremo amino terminal de los péptidos y que el ácido glutámico es el segundo aminoácido más abundante en la leche (Fennema *et al.*, 2007), se podría hipotetizar que la enzima

expresada en leche, tendría una actividad catalítica mayor para aprovechar tal aminoácido.

Todos los valores de actividad PepC están comprendidos en un intervalo de 0 a 62.91 nanomoles de pNA min^{-1} mg de proteína $^{-1}$. Luoma *et al* (2001), midieron la actividad PepC en una cepa de *L. lactis* subsp. *cremoris* que creció en leche durante 12 h y el valor que obtuvieron fue de *ca.* 50 nanomoles de pNA min^{-1} mg de proteína $^{-1}$.

De las cepas bajo estudio, sólo la cepa C1 mostró actividad PepI (0.41 nanomoles de pNA min^{-1} mg de proteína $^{-1}$). Aún no se ha caracterizado genéticamente ninguna iminopeptidasa en BAL del género *Lactococcus* (Savijoki *et al.*, 2006). No obstante, algunos autores han reportado actividad enzimática PepI al evaluar cepas de *L. lactis* con el sustrato cromogénico Pro-pNA. Piraino *et al* (2008), aislaron nueve cepas de *L. lactis* de quesos pasta filata y cultivos iniciadores naturales y al menos una cepa mostró actividad al usar el sustrato Pro-pNA. González *et al* (2010), aislaron trece cepas de *L. lactis* del queso español tradicional genestoso y detectaron también actividad PepI, en cinco cepas de *L. lactis*, usando el sustrato cromogénico Pro-pNA.

Los valores de actividad PepN están comprendidos dentro de un intervalo de 14.22 a 116.14 nanomoles de pNA min^{-1} mg de proteína $^{-1}$. Bachmann *et al* (2009) obtuvieron valores de actividad PepN entre 42.2 y 202.4 nanomoles de pNA min^{-1} mg de proteína $^{-1}$, al evaluar ochenta y cuatro cepas de *L. lactis* aisladas de ecosistemas lácteos y no lácteos; las cepas crecieron en un medio químicamente definido rico en nutrientes. Los valores obtenidos en ambos estudios son muy parecidos. Algaron *et al* (2004) encontraron que el %AIECA del conjunto de péptidos obtenidos durante la fermentación de leche, aumentaba de 45 a 75% cuando se comparaba una cepa nativa, con una cepa mutante sin el gen que codifica PepN. Este resultado sugirió que la actividad PepN podría hidrolizar péptidos inhibidores de la ECA. Kilpi *et al* (2007) fermentaron leche con una cepa de *Lactobacillus helveticus* mutante (sin el gen que codifica PepN). Al medir el %AIECA del conjunto de péptidos obtenidos durante la fermentación, se

observó que el %AIECA era mayor para la cepa mutante. Este resultado sugiere que la actividad PepN podría inactivar péptidos inhibidores de la ECA.

Los valores de actividad PepX están comprendidos dentro de un intervalo de 11.36 a 271.87 nanomoles de pNA min⁻¹ mg de proteína⁻¹. Bachmann *et al* (2009) obtuvieron valores de actividad PepX entre 15.8 y 250.5 nanomoles de pNA min⁻¹ mg de proteína⁻¹, al evaluar 84 cepas de *L. lactis* aisladas de ecosistemas lácteos y no lácteos; las cepas crecieron en un medio químicamente definido rico en nutrientes. Los valores obtenidos en ambos estudios son muy parecidos. Algaron *et al* (2004) encontraron que el %AIECA del conjunto de péptidos obtenidos durante la fermentación de leche, aumentaba de 45 a 70% cuando se comparaba una cepa nativa, con una cepa mutante sin el gen que codifica PepX. Este resultado sugirió que la actividad PepX podría degradar péptidos inhibidores de la ECA. Kilpi *et al* (2007), fermentaron leche con una cepa de *Lactobacillus helveticus* mutante (sin el gen que codifica PepX). Al medir el %AIECA del conjunto de péptidos obtenidos durante la fermentación, se observó que el %AIECA era mayor para la cepa mutante. Este resultado sugiere que la actividad PepX podría inactivar péptidos inhibidores de la ECA.

En la tabla 12 se puede observar que las actividades enzimáticas que más veces se presentaron en el sobrenadante de la leche fermentada fueron PepX y PepN. En el caso de la actividad PepX, Pérez *et al* (2004), encontraron que a la aminopeptidasa PepX se le podía encontrar tanto en el citoplasma, como en la membrana celular; lo que sugería la presencia de formas moleculares múltiples. Se sabe que el resto de las peptidasas evaluadas en este estudio se encuentran exclusivamente en el citoplasma. A la aminopeptidasa PepX asociada a la membrana celular le resultaría más fácil migrar al exterior de la célula sin necesidad de la autólisis. Posiblemente esta sea la razón por la que se presenta con tanta frecuencia en el sobrenadante de la leche fermentada.

La autólisis es la razón principal por la que se detectaron las actividades peptidasa en el sobrenadante de las leches fermentadas. En una cepa no autolítica, las enzimas son degradadas durante la fase de senescencia, por lo que son útiles sólo en células viables.

Tabla 12. Valores de actividad peptidasa de sobrenadantes de leches fermentadas por cepas de *L. lactis* durante 12 h

Cepa	Actividad PepA ¹	Actividad PepC ¹	Actividad PepI ¹	Actividad PepN ¹	Actividad PepX ¹
C1	ND ²	0.17 ± 0.016	ND ²	ND ²	ND ²
E1	ND ²	0.17 ± 0.016	0.24 ± 0.016	0.22 ± 0.016	0.20 ± 0.019
M1	1.45 ± 0.049	0.41 ± 0.016	ND ²	0.38 ± 0.016	1.19 ± 0.034
Q3	1.73 ± 0.181	2.37 ± 0.230	1.84 ± 0.099	0.58 ± 0.033	2.45 ± 0.243
K3	ND ²	ND ²	ND ²	0.43 ± 0.016	0.37 ± 0.037
K1	ND ²	ND ²	ND ²	ND ²	0.40 ± 0.037
M7	ND ²	ND ²	ND ²	ND ²	0.20 ± 0.019
M5	ND ²	ND ²	ND ²	0.37 ± 0.033	ND ²
P2	0.24 ± 0.016	ND ²	ND ²	0.72 ± 0.066	0.20 ± 0.019
K5	ND ²	ND ²	ND ²	0.29 ± 0.016	0.31 ± 0.019
R1	0.87 ± 0.082	ND ²	0.95 ± 0.033	0.42 ± 0.033	0.81 ± 0.056
J6	1.31 ± 0.115	ND ²	0.94 ± 0.049	ND ²	0.52 ± 0.019
Z2	0.66 ± 0.049	1.30 ± 0.132	ND ²	0.73 ± 0.049	0.99 ± 0.093
B7	ND ²	0.22 ± 0.016	ND ²	0.27 ± 0.016	0.31 ± 0.019

¹Valores expresados en nanomoles de pNA min⁻¹. Promedio ± desviación estándar de duplicado

²No detectada

En una cepa autolítica, las enzimas liberadas a la matriz alimentaria, siguen siendo funcionales, aunque la célula ya no sea viable. Estas enzimas contribuirían a la formación y degradación de péptidos inhibidores de la ECA (Østlie *et al.*, 1995).

En la tabla 12 se observa que la actividad peptidasa detectada en el sobrenadante de la leche fermentada por la cepa Q3, ejemplifica el comportamiento de una célula muy

autolítica. Las actividades PepC, PepI, PepN y PepX detectadas en el contenido intracelular de esta cepa exhibieron valores de 0 %. En consecuencia, el 100% de estas actividades se detectó en el sobrenadante.

Tabla 13. Actividad peptidasa de sobrenadantes de leches fermentadas por cepas de *L. lactis* (< 12 h)

Cepa	Actividad PepA ¹	Actividad PepC ¹	Actividad PepI ¹	Actividad PepN ¹	Actividad PepX ¹
R7	0.17 ± 0.016	ND ²	ND ²	0.20 ± 0.016	ND ²
LLC	ND ²	ND ²	ND ²	0.173 ± 0.016	0.20 ± 0.019
Q2	0.50 ± 0.049	0.17 ± 0.016	0.29 ± 0.016	0.20 ± 0.016	0.25 ± 0.019
Q1	0.44 ± 0.033	ND ²	ND ²	ND ²	0.23 ± 0.019
Z1	1.24 ± 0.115	0.60 ± 0.033	1.08 ± 0.082	0.22 ± 0.016	0.25 ± 0.019
E3	ND ²	0.38 ± 0.016	0.17 ± 0.016	0.27 ± 0.016	0.20 ± 0.019

¹Valores expresados en nanomoles de pNA min⁻¹. Promedio ± desviación estándar de duplicado

²No detectada

Finalmente, para establecer la relación entre las actividades peptidasa y el IC₅₀, se construyó un modelo estadístico usando la rutina de selección de variables conocida como “Todas las regresiones posibles”. La rutina obtuvo el mejor modelo desde una hasta doce variables independientes. Se seleccionó el mejor modelo de cuatro variables independientes porque el número mínimo de observaciones por variable independiente debe ser cinco (Hair *et al.*, 2001). Las cuatro variables independientes incluidas en el mejor modelo fueron: a) actividad PepN de contenido intracelular, b) actividad PepC de sobrenadante, c) actividad PepX de contenido intracelular y d) capacidad acidificante.

La ecuación del modelo de regresión lineal múltiple más adecuada fue:

$$\begin{aligned} \text{IC}_{50} = & 766.10 - 1897.86*\text{CA} - 1062.22*\text{PepCSN} - 102.78*\text{PepNE} - 51.76*\text{PepXE} + \\ & 4444.80*\text{CA}*\text{PepCSN} + 332.38*\text{CA}*\text{PepNE} + 153.77*\text{CA}*\text{PepXE} + \\ & 941.45*\text{PepCSN}*\text{PepNE} - 596.75*\text{PepCSN}*\text{PepXE} + 9.51*\text{PepNE}*\text{PepXE} - \\ & 2633.95*\text{CA}*\text{PepCSN}*\text{PepNE} + 1440.21*\text{CA}*\text{PepCSN}*\text{PepXE} - \\ & 30.48*\text{CA}*\text{PepNE}*\text{PepXE} - 0.77*\text{PepCSN}*\text{PepNE}*\text{PepXE} \quad (1) \end{aligned}$$

El modelo cumple con los supuestos de normalidad, linealidad y homocedasticidad. El coeficiente de determinación (R^2) del modelo fue de 0.9943, lo cual significa que el 99.43% del comportamiento de los valores de IC_{50} pudieron ser explicados por las variables independientes. La probabilidad del modelo fue de 0.0001.

En la tabla 14 se observa que a medida que la actividad PepN aumenta, el valor de IC_{50} disminuye. En primer lugar, se ha demostrado que la enzima PepN purificada, hidroliza parcialmente varios oligopéptidos de 7 a 16 residuos obtenidos de la hidrólisis de β -caseína con tripsina, demostrando la capacidad de PepN de liberar residuos de sustratos relativamente grandes. Algunos de estos sustratos podrían ser precursores de péptidos inhibidores de la ECA. Estos resultados enfatizan la importancia que tiene PepN en la hidrólisis de los péptidos obtenidos durante la fermentación de la leche con cepas de *L. lactis* (Mierau et al., 1996; Meijer et al., 1997; Christensen *et al.*, 1999).

En la tabla 14 se observa que a medida que la actividad PepC del sobrenadante aumenta, el valor de IC_{50} disminuye. La autólisis celular sería responsable de liberar la enzima PepC a la leche, esta enzima, promovería entonces la formación de péptidos con valores bajos de IC_{50} (Østlie *et al.*, 1995). La enzima PepC es una aminopeptidasa de amplia especificidad que remueve residuos ácidos, básicos, hidrofóbicos sin carga y aromáticos del extremo N de los péptidos obtenidos durante la fermentación y por su amplia especificidad podría remover muchos tipos de residuos diferentes para formar péptidos inhibidores de la ECA (Christensen *et al.*, 1999).

Tabla 14. Términos de la ecuación del modelo de regresión lineal múltiple

Término	Coefficiente	Probabilidad
CA ¹	-1897.8617	0.0388
PepCSN ¹	-1062.2220	0.0002
PepNE ¹	-102.7785	0.0190
PepXE	-51.7560	0.2179
CA*PepCSN ¹	4444.8037	0.0002
CA*PepNE ¹	332.3756	0.0283
CA*PepXE	153.7670	0.2263
PepCSN*PepNE ¹	941.4497	0.0001
PepCSN*PepXE ¹	-596.7453	0.0003
PepNE*PepXE	9.5083	0.0734
CA*PepCSN*PepNE ¹	-2633.9512	0.0004
CA*PepCSN*PepXE ¹	1440.2124	0.0006
CA*PepNE*PepXE	-30.4792	0.0758
PepCSN*PepNE*PepXE	-0.7733	0.6550

¹Términos significativos ($p < 0.050$)

En la tabla 14 se observa que a medida que la capacidad acidificante aumenta, el valor de IC₅₀ disminuye. ST-Gelais Daniel y Haché Sylvie (2006) mencionan que las cepas con capacidad acidificante alta poseen también actividad proteolítica alta. La mejor comparación entre cepas con capacidad acidificante alta y cepas con actividad acidificante baja, se da al contrastar las cepas de *L. lactis* proteasa-positivas (PrpP⁺) y proteasa-negativas (PrpP⁻). Las cepas PrpP⁺ poseen una proteasa extracelular que

hidroliza las proteínas de la leche y provee de oligopéptidos a los mecanismos de transporte. Los mecanismos de transporte ingresan los oligopéptidos al citoplasma para que las peptidasas produzcan los aminoácidos que la célula necesita. Adicionalmente, las cepas PrtP⁺ poseen tasas de acidificación altas. Su gran capacidad proteolítica y acidificante les permite crecer a densidades celulares muy grandes. Cuando crecen en leche, se observan en su curva de crecimiento 2 fases logarítmicas. Durante la primera fase logarítmica usan los péptidos y aminoácidos presentes de manera natural en la leche como fuente de nitrógeno. Al final de esta fase habilitan su proteasa y durante la segunda fase, el nitrógeno se obtiene a partir de la proteasa habilitada.

Con las cepas PrtP⁻ ocurre lo opuesto. No tienen el gen que codifica la proteasa, pero si tienen mecanismos de transporte y peptidasas. Tienen capacidades proteolíticas y acidificantes muy limitadas. En consecuencia, crecen a densidades celulares muy bajas y solo tienen una fase logarítmica en su curva de crecimiento. En resumen, una capacidad acidificante alta en una cepa de *L. lactis* se correlaciona con una proteólisis alta. Esta proteólisis alta podría ser la responsable de la producción de péptidos con valores bajos de IC₅₀ (ST-Gelais Daniel y Haché Sylvie, 2006).

CONCLUSIONES

En la selección de cepas de *L. lactis* para la producción de leches fermentadas con actividad potencialmente antihipertensiva, estas deberán presentar actividad aminopeptidasa PepN en su contenido intracelular. Además, es necesario que las cepas sean autolíticas para que sean capaces de liberar aminopeptidasa PepC en la leche que fermentan. Por otro lado, también es necesario que las cepas sean acidificantes. El conocimiento generado, podría facilitar la búsqueda de nuevas cepas aisladas de la naturaleza con buena capacidad para generar péptidos antihipertensivos.

BIBLIOGRAFÍA

- Algaron, F., D. Miranda, G. and Monnet, V. Milk fermentation by *Lactococcus lactis* with modified proteolytic systems to accumulate potentially bio-active peptides. *Lait*. 84 (2004) 115–123.
- Bachmann, H., Starrenburg, M. J. C., Dijkstra, A., Molenaar, D., Kleerebezem, M., Rademaker, J. L. W. and Van, J. E. T. Regulatory Phenotyping Reveals Important Diversity within the Species *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009. 75 (17) 5687–5694.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- Chapot-Chartier, M. P., Nardi, M., Chopin, M.C., Chopin, A. and Gripon, J.C. Cloning and Sequencing of pepC, a Cysteine Aminopeptidase Gene from *Lactococcus lactis* subsp. cremoris AM2. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993. 59 (1) 330-333.
- Chen, G. W., Tsai, J. S. and Sun B. Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation. *International Dairy Journal* 17 (2007) 641–647.
- Chobanian, A. V., Bakris, G. L., Black, H. R., Cushman, W. C. *et al.*, The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *J. Am. Med. Assoc.* 289 (2003) 2560–2571.
- Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A. and Steele, J.L. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76 (1999) 217–246.
- Christensen, J. E., Broadbent, J. R. and Steele, J. L. Hydrolysis of Casein-Derived Peptides α_51 -Casein(f1-9) and β -Casein(f193-209) by *Lactobacillus helveticus* Peptidase Deletion Mutants Indicates the Presence of a Previously Undetected Endopeptidase. *Applied and Environmental Microbiology*. (2003) 1283–1286.
- CODEX STAN 243-2003. CODEX Standard for Fermented Milks. Adopted in 2003. Revised in 2008 and 2010. *Codex Alimentarius*. Rome, Italy. 11 pp.
- Cogan, T. M., Beresford, T. P., Steele, J.L., Broadbent, J., Shah, N. P. and Ustunol, Z. Advances in starter cultures and cultured foods. *J. Dairy Sci.* 90 (2007) 4005–4021.
- Cushman, D. W. and Cheung, H. S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* 20 (1971) 1637-1648.

- Doeven, M. K., Kok, J. and Poolman, B. Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Mol Microbiol.* 57 (2005) 640–649.
- Donkor, O. N., Henriksson, A., Singh, T. K., Vasiljevic, T. and Shaha, N. P. ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *Int. Dairy J.* 17 (2007) 1321–1331.
- El Soda, M., and Desmazeaud, M. Les peptide hydrolases des lactobacilles du groupe *Thermobacterium*. I. Mise en évidence de ces activités chez *Lactobacillus helveticus*, *L. acidophilus*, *L. lactis* et *L. bulgaricus*. *Can. J. Microbiol.* 28 (1982)1181–1188.
- Exterkate, F. A., Alting, A. C. and Bruinenberg, P. G. Diversity of cell envelope proteinase specificity among strains of *Lactococcus lactis* and its relationship to charge characteristics of the substrate-binding region. *Applied and Environmental Microbiology.* 59 (1993) 3640-3647.
- Fennema, O.R. 2007. Fennema's Food Chemistry. CRC Press. Fourth Edition. New York. 1,160 pp.
- FitzGerald, R. J. and Meisel, H. Milk Protein-Derived Peptide Inhibitors of Angiotensin-I-Converting Enzyme. *British Journal of Nutrition.* 84 (2000), Suppl. 1, S33-S37.
- FitzGerald, R. J., Murray B. A. and Walsh D. J. Hypotensive Peptides from Milk Proteins. *J. Nutr.* 134 (2004) 980–988.
- FitzGerald, R. J. and Murray, B. A. Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology.* 59 (2006) 2, 118-125.
- González, L., Sacristán, N., Arenas, R., Fresno, J.M. and Tornadijo, M.E. Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. *Food Microbiology.* 27 (2010) 592-597.
- Gutiérrez-Méndez, N., Rodríguez-Figueroa J. C., González-Córdova, A. F., Nevárez-Moorillón, G. V., Rivera-Chavira B. and Vallejo-Córdova, B. Phenotypic and genotypic characteristics of *Lactococcus lactis* strains isolated from different ecosystems. *Can. J. Microbiol.* 56 (2010) 432–439.
- Hair, J., Anderson, R. and Tatham, R. 2001. Análisis Multivariante. Prentice-Hall. 5ª Edición. Madrid, España. 768 pp.
- Hayes M., Stanton C., FitzGerald G. F. and Ross R. P. Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: Bioactive peptide functions, *Biotechnology Journal.* 2 (2007) 435–449.

- Helinck, S., Richard, J. and Juillard, V. The effects of adding lactococcal proteinase on the growth rate of *Lactococcus lactis* in milk depend on the type of enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 2124–2130.
- Hellendoorn, M. A., Franke B. M. D., Mierau, I., Venema, G. and Kok, J. Cloning and analysis of the *pepV* dipeptidase gene of *Lactococcus lactis* MG1363. *J. Bacteriol.* 179 (1997) 3410–3415.
- Hernández Ledesma, Blanca. (2002). Caracterización y bioactividad de péptidos obtenidos a partir de proteínas lácteas mediante hidrólisis enzimática y procesos fermentativos. Tesis doctoral. Departamento de Nutrición y Bromatología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. 234 pp.
- Hernández, B., Contreras, M. and Recio, I. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into Foods. *Advances in Colloid and Interface Science* 165 (2011) 23–35.
- Hintze, J. (2007). NCSS 2007. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA. www.ncss.com.
- Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W. and Chi, L. The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs? *Peptides* 29 (2008) 1062-1071.
- I'Anson, K. J. A., Movahedi, S., Griffin, H. G., Gasson, M. J. and Mulholland, F. A non-essential glutamyl aminopeptidase is required for optimal growth of *Lactococcus lactis* MG1363 in milk. *Microbiology.* 141 (1995) 2873-2881.
- Jay, J. M. 2005. *Modern Food Microbiology*. Springer Science & Business Media, Inc. Seventh Edition. New York. 790 pp.
- Jauhiainen, T., Vapaatalo, H., Poussa, T., Kyronpalo, S., Rasmussen, M. and Korpela, R. *Lactobacillus helveticus* fermented milk lowers blood pressure in hypertensive subjects in 24-h ambulatory blood pressure measurement. *Am. J. Hypertens.* 18 (2005) 1600–1605.
- Jauhiainen, T., Ronnback, M., Vapaatalo, H., Wuolle, K., Kautiainen, H. and Korpela, R. *Lactobacillus helveticus* fermented milk reduces arterial stiffness in hypertensive subjects. *Int. Dairy J.* 17 (2007) 1209–1211.
- Juillard, V., Furlan, S., Foucaud, C. and Richard, J. Mixed Cultures of Proteinase-Positive and Proteinase-Negative Strains of *Lactococcus lactis* in Milk. *J Dairy Sci* 79 (1996) 964-970.
- Kilpi, E. E.-R., Kahala, M. M., Steele, J. L., Pihlanto, A. M. & Joutsjoki, V. V. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in milk fermented by wild-type and peptidase-deletion derivatives of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *International Dairy J.* 17 (2007) 976-984.

- Kok, Jan. Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87 (1990) 15– 42.
- Korhonen, H. and Pihlanto, A. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal.* 16 (2006) 945–960.
- Korhonen, Hannu. Milk-derived bioactive peptides: From Science to applications. *J. Functional Foods.* 1 (2009) 177-187.
- Kunji, E. R. S., Smid, E. J., Plapp, R., Poolman, B. and Konings, W. N. Di-tripeptides and oligopeptides are taken up via distinct transport mechanisms in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* 175 (1993) 2052–2059.
- Kunji, E. R. S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B. and Konings, W. N. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 70 (1996) 123-131.
- Law J. and Haandrikman, A. Proteolytic Enzymes of Lactic Acid Bacteria. *Int. Dairy Journal* 7 (1997) 1-11.
- Leroy, F. and De Vuyst, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15 (2004) 67-78.
- Martínez, Cecilia. Dipeptidil carboxipeptidasa (enzima convertidora de la angiotensina). *Química Clínica* 11 (1992) I, 8-16.
- Matos, J., Nardi, M., Kumura, H. and Monnet, V. Genetic characterization of *pepP*, which encodes an aminopeptidase P whose deficiency does not affect *Lactococcus lactis* growth in milk, unlike deficiency of the X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 4591–4595.
- Mayo, B., Aleksandrak, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez, P. and Bardowski, J. 2010. Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. En: Mozzi, F., Raya, R.R. and Vignolo, G.M. (eds.). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications.* Wiley Blackwell. 650 pp.
- Meijer, W. C., Marugg, J. D. and Hugenholtz, J. Regulation of proteolytic enzyme activity in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (1996) 156–161.
- Meijer, W. C. and Hugenholtz, J. Proteolytic Enzyme Activity in *Lactococci* Grown in Different Pretreated Milk Media. *J. Appl. Microbiol.* 83 (1997) 139-146.
- Mierau, I., Tan, P. S., Haandrikman, A. J., Mayo, B., Kok, J., Leenhouts, K. J., Konings, W. N. and Venema, G. Cloning and sequencing of the gene for a *lactococcal* endopeptidase, an enzyme with sequence similarity to mammalian enkephalinase. *J. Bacteriol.* 175 (1993) 2087–2096.

- Mierau, I., Haandrikman, A. J., Velterop, O., Tan, P. S. T., Leenhouts, K. L., Konings, W. N., Venema, G. and Kok, J. Tripeptidase Gene (*pepT*) of *Lactococcus lactis*: Molecular Cloning and Nucleotide Sequencing of *pepT* and Construction of a Chromosomal Deletion Mutant. *Journal of Bacteriology*. 176 (1994) 10, 2854-2861.
- Mierau, I., Kunji, E. R. S., Leenhouts, J., Hellendoorn, M. A., Haandrikman, J., Poolman, B., Konings, W. N., Venema, G. and Kok, J. Multiple peptidase-deficient mutants of *Lactococcus lactis* are severely impaired in their ability to grow in milk. *J. Bacteriol.* 178 (1996) 2794–2803.
- Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C. G., Fox, P. F., Monnet, V. and Gobbetti, M. Angiotensin I-Converting-Enzyme-Inhibitory and Antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *App. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 5297-5305.
- Monnet, V., Nardi, M., Chopin, A., Chopin, M. C. and J. Gripon. Biochemical and genetic characterization of *PepF*, an oligopeptidase from *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 32070–32076.
- Muguerza, B., Ramos, M., Sánchez, E., Manso, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., Delgado, M. A. and Recio, I. Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *Int. Dairy J.* 16 (2006) 61–69.
- Nardi, M., Chopin, M.-C., Chopin, A., Cals, M.-M. and Gripon, J.-C. Cloning and sequence analysis of an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase gene from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1991) 45–50.
- Nardi, M., Renault, P. and Monnet, V. Duplication of the *pepF* gene and shuffling of DNA fragments on the lactose plasmid of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 179 (1997) 4164–4171.
- Nielsen, M. S., Martinussen, T., Flambard, B., Sorensen, K. I. and Otte, J. Peptide profiles and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *International Dairy Journal*. 19 (2009) 155-165.
- Niven, Gordon W. Purification and characterization of amino-peptidase A from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* NCDO 712. *J. Gen. Microbiol.* 137 (1991) 1207–1212.
- OMS. 2009. Global health risks, mortality and burden of disease attributable to selected major risks. 1-62.

- Østlie, H. M., Vegarud, G. and Langsrud, T. Autolysis of *Lactococci*: detection of lytic enzymes by polyacrylamide gel electrophoresis and characterization in buffer systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(1995) 3598–3603.
- Pérez, A. E., Cruz y Victoria, T., Cruz, R. and Hernández, H. Improvement of fermentation conditions for the production of X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 20 (2004) 413–417.
- Pierre, Y.V. 2008. *Fermentation*. Wiley-Blackwell. First Edition. New York. 1026 pp.
- Pihlanto, A., Virtanen, T. and Korhonen, H. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *Int. Dairy J.* 20 (2010) 155-165.
- Piraino, P., Zotta, T., Ricciardia, A., McSweeney, P. and Parentea, E. Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheeses: A multivariate screening study. *International Dairy Journal.* 18 (2008) 81–92.
- Qian, B., Xing, M., Cui, L., Deng, Y., Xu, Y., Huang, M. and Zhang, S. Antioxidant, antihypertensive, and immunomodulatory activities of peptide fractions from fermented skim milk with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB340. *Journal of Dairy Research.* 78 (2011) 72–79.
- Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A. and Recio, I. Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *Int. Dairy J.* 17 (2007) 33–41.
- Quirós A., Contreras M. D. M., Ramos, M., Amigo L. and Recio, I. Stability to gastrointestinal enzymes and structure–activity relationship of β -casein peptides with antihypertensive properties. *Peptides.* 30 (2009) 1848–1853.
- Rodríguez-Figueroa, J. C., Reyes-Díaz, R., González-Córdova, A. F., Troncoso-Rojas, R., Vargas-Arispuro, I. and Vallejo-Córdova, B. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk fermented by wild and industrial *Lactococcus lactis* strains. *J. Dairy Sci.* 93 (2010) 5032–5038.
- Savijoki, K., Ingmer, H. and Varmanen, P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 71 (2006) 394-406.
- Sentandreu, M. A. and Toldra, F. A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. *Food Chem.* 97 (2006) 546-554.
- Server, C., Danzart, M., Juillard, V. and Leveau, J. Characterization and selection of dairy *Lactococci* based on statistical analyses of biochemical and technological properties. *Lait.* 78 (1998) 543-556.

- Shalaby, S. M., Zakora, M. and Otte, J. Performance of two commonly used angiotensin-converting enzyme inhibition assays using FA-PGG and HHL as substrates. *J. Dairy Res.* 73 (2006) 178-186.
- Siezen, Roland J. Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 76 (1999) 139–155.
- ST-Gelais, Daniel and Haché, Sylvie. Growth of proteinase-positive and proteinase negative *Lactococci* strains in reconstituted goat and cow milks. *Lait* (2006) 373–386.
- Strømman, P. Sequence of a gene (*lap*) encoding a 95.3-kDa aminopeptidase from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* Wg2. *Gene.* 113 (1992) 107–112.
- Takano, Toshiaki. Milk derived peptides and hypertension reduction. *Int. Dairy J.* 8 (1998) 375–381.
- Tamime, A.Y. 2006. *Fermented Milks.* Blackwell Science Ltd. First Edition. Iowa, USA. 262 pp.
- Tan, P. S. T., Chapot-Chartier, M.-P., Pos, K. M., Rousseau, M., Bocquien, C.-Y., Gripon, J. C. and Konings, W. N. Localization of peptidases in *Lactococci*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 285–290.
- Tavares, T., Sevilla, M. A., Montero, M. J., Carrón, R. and Malcata, F. X. Acute effect of whey peptides upon blood pressure of hypertensive rats, and relationship with their angiotensin-converting enzyme inhibitory activity. *Mol. Nutr. Food Res.* 56 (2012) 316–324.
- Teuber, M. and Geis, A. The Genus *Lactococcus*. *Prokaryotes.* 4 (2006) 205–228.
- Thomas, S., Besset, C., Courtin, P. and Rul, F. The role of aminopeptidase PepS in the growth of *Streptococcus thermophilus* is not restricted to nitrogen nutrition. *Journal of Applied Microbiology.* 108 (2010) 148–157.
- Tsai, J. S., Chen, T. J., Sun B., Gong S. D. and Chung, M.Y. Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk. *Food Chemistry* 106 (2008) 552–558.
- Tuler, T. R., Callanan, M. J. and Klaenhammer, T. R. Overexpression of Peptidases in *Lactococcus* and Evaluation of Their Release from Leaky Cells. *J. Dairy Sci.* 85 (2002) 2438–2450.
- Tynkkynen, S., Buist, G., Kunji, E., Kok, J., Poolman, B., Venema, G., and Haandrikman, A. Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 175 (1993) 7523–7532.

- Van, J.E.T. and Hugenholtz J. Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavor and health benefits. *International Dairy Journal*. 17 (2007) 1290–1297.
- Walstra, P. 2006. *Dairy Science and Technology*. Taylor & Francis Group, LLC. Second Edition. New York. 763 pp.
- Wouters, J. T. M., Ayad, E. H. E., Hugenholtz, J., Smit, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* 12 (2002) 91-109.