

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

“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ASOCIADA A  
PÉPTIDOS BIOACTIVOS DERIVADOS DE LECHE  
FERMENTADAS CON CEPAS DE *Lactococcus lactis* AISLADAS  
DE DIFERENTES ECOSISTEMAS”

POR:

**VANESSA SARACHO ALVAREZ**

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 2011

## APROBACION

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis de la Q.B. Vanessa Saracho Álvarez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



---

Dr. Aarón Fernando González Córdova


Director de Tesis



---

Dra. Belinda Vallejo Galland

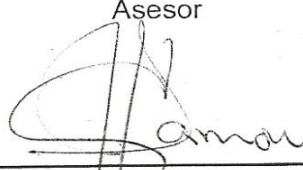
Asesora



---

Dr. Adrián Hernández Mendoza

Asesor



---

Dr. Juan Pedro Camou Arreola

Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

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

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en ésta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación por escrito del Director de la tesis.



Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por abrirme las puertas de sus instalaciones con el fin de ampliar mis horizontes intelectuales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo académico que me brindo para llevar a cabo mis estudios de maestría.

A quien jamás encontraré la forma de agradecer y de todo corazón a mi Director de tesis el Dr. Aarón Fernando González Córdova por su amistad, apoyo incondicional, consejos y sobre todo la paciencia que me tuvo. Muchas, muchas gracias por permitir que realizara una de mis más grandes metas.

A la Dra. Belinda Vallejo Galland coordinadora de la CTAOA por su apoyo, confianza y tiempo durante la maestría y sobre todo por darme la oportunidad de ampliar mis conocimientos hacia la ciencia. Gracias.

Al Dr. Adrián Hernández por su disposición, apoyo y ánimo que me brindó, gracias por los seminarios me ayudaron muchísimo.

Al Dr. Juan Pedro Camoú por sus comentarios en el proceso de elaboración de la tesis y sus atinadas correcciones.

A Lilia María Beltrán Barrientos por su amistad, fuiste la primer persona que conocí en CIAD y al Dr. Roberto Rodríguez Ramírez, por su dedicación y apoyo a través de todo el trabajo experimental. Gracias por todos los momentos de risa y carrilla que me dieron.

Al equipo de trabajo de Laboratorio de Lácteos, M. en C. Carmen Estrada Montoya, Dra. María de Jesús Torres Llanez por su colaboración y apoyo técnico.

Además a la técnico Karla Martínez por su ayuda y apoyo técnico en este trabajo, gracias.

Al grupo de trabajo de Pesqueros integrado por las M. en C. María Elena Lugo, Guillermina García y Dra. Susana por compartir sus instalaciones.

A la Dra. Gloria Yepiz por su apoyo como coordinadora de docencia.

Al personal del CIAD que siempre me atendieron, en especial a Fernando Leyva, Gerardo Reyna, Luis Conde, Faly Gil Lamadrid, Laura García, Verónica Araiza, Argelia Marín, Hector Galindo y Hector Cota.

Al M. en C. Ricardo Reyes Díaz por ayudarme en el estadístico, siempre estás cuando te necesito.

A mis compañeros inseparables de laboratorio Graciela Zavala y Eleazar Aguilar Tóala por su infinita ayuda, amistad y acompañarme por las noches en el laboratorio y por soportarme, muchas gracias.

Más que compañeros de laboratorio, a mis amigos Priscilia Heredia, Sarahí Rangel, Lourdes Santiago y Jesús Sosa gracias por apoyarme en TODO, por los momentos que pasamos en el laboratorio y por los convivios de fin de semana.

Al super equipo del laboratorio de lácteos José Carlos Rodríguez, Jesús Monzón, Montserrat Vargas, Sergio Hermosillo, Elena Corzo, Ángeles Aguilera, Alejandro Santos, Geovanni Arguëllo, José Miguel Serrano, Rocío Hernández, a las chicas de Mochis Trinidad López y Elvia Medina; a los acapulqueños Isidro Méndez, Ángel Ortiz, Fausto Cantu, Rogelio Salazar y Cristóbal Hernández, muchas gracias.

Gracias también a mis compañeros de maestría, que me apoyaron y me permitieron entrar en su vida durante estos dos años de convivir dentro y fuera del salón de clases: Nidia Valenzuela, Nayelly Pérez, Gustavo Ramírez, Ana Luisa Martínez, Karla Martínez y Gabriel Fuentes, gracias.

A mis amigas de toda la vida Laura, Nancy, Karla, Bibiana, Flor, Érika, Liz y mis amigos de la carrera Karla, Beto, Mily, Ana María, Nadia y Yosi por los momentos inolvidables que hemos pasado, gracias por su cariño y compañía.

## **DEDICATORIA**

A Dios porque sin él no soy nada, gracias por tu amor y por las miles de bendiciones que me has dado. A ti sea toda la gloria.

A mis papás por sus esfuerzos realizados para que yo lograra terminar la Maestría y que de forma incondicional me apoyaron en todo, gracias por su amor y cariño. Los amo mucho.

A mi mamá hermosa por su apoyo moral, su cariño y comprensión que desde niña me has brindado, por guiar mi camino y estar junto a mí en los momentos más difíciles. Siempre has sido mi heroína.

A mi papá porque desde pequeña ha sido mi defensor y un gran hombre al que siempre he admirado. Gracias por tus consejos.

A mis dos hermanos Rubén y Christian, ya que en las buenas y en las malas se que cuento con ellos siempre.

A mi tíos Adriana y Carlos por apoyarme siempre.

“Los pueblos que solo enseñan a memorizar y que apenas investigan nada aportan, pasan desapercibidos y con el tiempo desaparecen. Solo los creativos e innovadores permanecen”.

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	3
2.1.	Estrés Oxidativo .....	3
2.2.	El Deterioro de los Lípidos .....	6
2.3.	Reducción de los Radicales Libres en los Seres Vivos e Inhibición de la Oxidación de Lípidos .....	8
2.3.1.	Alimentos Funcionales .....	11
2.3.2.	Componentes Bioactivos de la Leche .....	14
2.4.	Péptidos Antioxidantes.....	17
2.4.1.	Características de los Péptidos Antioxidantes .....	18
2.4.2.	Péptidos Antioxidantes en el Suero de la Leche .....	19
2.5.	Producción de Péptidos Antioxidantes Empleando Fermentos Microbianos .....	20
2.6.	<i>Lactococcus lactis</i> ( <i>L. lactis</i> ).....	23
2.6.1.	Sistema Proteolítico de <i>L. lactis</i> .....	24
2.6.2.	Leches Fermentadas con Cepas de <i>L. lactis</i> .....	25
2.7.	Evaluación de la Capacidad Antioxidante .....	27
III.	HIPÓTESIS .....	30
IV.	OBJETIVOS .....	31
4.1.	Objetivo General .....	31
4.2.	Objetivos Particulares.....	31
V.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	32



5.1.	Reactivación de las Cepas de <i>Lactococcus lactis</i> .....	32
5.2.	Curvas de Crecimiento de Cepas de <i>Lactococcus lactis</i> en Leche Fermentada .....	32
5.3.	Capacidad Acidificante de las Cepas de <i>Lactococcus lactis</i> .....	34
5.4.	Obtención de Fracciones a partir del Suero de la Leche Fermentada..	34
5.5.	Contenido de Material Proteico de las Distintas Fracciones del Suero de la Leche Fermentada.....	35
5.6.	Almacenamiento de las Fracciones.....	35
5.7.	Preparación de las Fracciones (Extractos Acuosa) .....	36
5.8.	Evaluación de la Actividad Antioxidante <i>In vitro</i> en las Fracciones Derivadas de Leches Fermentadas con <i>Lactococcus lactis</i> Utilizando la Técnica ABTS.....	36
	Evaluación de la Actividad Antioxidante <i>In vitro</i> de las Fracciones Derivadas de Leches Fermentadas con <i>Lactococcus lactis</i> Utilizando la Técnica DPPH. ....	37
5.10	Análisis Estadístico.....	38
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	40
6.1.	Curvas de Crecimiento en Leche .....	40
6.2.	Capacidad Acidificante.....	45
6.3.	Concentración Peptídica de las Distintas Fracciones del Suero de la Leches Fermentadas.....	47
6.4.	Preparación Liofilizados a partir de los Extractos Peptídicos de la Leche Fermentada .....	50
6.5.	Evaluación de la Capacidad Antioxidante <i>in vitro</i> en las Fracciones Peptídicas Derivadas de las Leches Fermentadas Utilizando la Técnica ABTS.....	51

6.5.1. Capacidad Antioxidante Expresada como Equivalentes de TROLOX (TEAC) Utilizando la Técnica ABTS .....	51
6.5.2. Actividad Antioxidante Utilizando técnica ABTS.....	57
6.6. Evaluación de la Actividad Antioxidante <i>in vitro</i> de las Fracciones Peptídicas Derivadas de las Leches Fermentadas Utilizando la Técnica DPPH. ....	66
6.6.1. Capacidad Antioxidante Expresada en Equivalentes de TROLOX (TEAC) Utilizando la Técnica DPPH. ....	66
6.6.2. Actividad antioxidante Utilizando la Técnica DPPH .....	73
VII. CONCLUSIONES.....	79
VIII. REFERENCIAS.....	80

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los antioxidantes naturales .....	10
<b>Tabla 2.</b> Péptidos con actividad biológica derivados de las proteínas de la leche.....	16
<b>Tabla 3.</b> Actividad antioxidante del suero de leches fermentadas de cepas de <i>L. lactis</i> .....	26
<b>Tabla 4.</b> Código de identificación y origen del aislamiento de las cepas de <i>L. lactis</i> empleadas en este estudio.....	33
<b>Tabla 5.</b> Contenido de material proteico en la fase exponencial de la curva de crecimiento bacteriano.....	48
<b>Tabla 6.</b> Contenido de material proteico en la fase estacionaria de la curva de crecimiento bacteriano.....	49
<b>Tabla 7.</b> Capacidad antioxidante en leches fermentadas por 2 h (fase exponencial) y 10 h (fase estacionaria) con cepas de <i>L. lactis</i> aisladas de lácteos artesanales determinada con la técnica ABTS.....	54
<b>Tabla 8.</b> Capacidad antioxidante en leches fermentadas por 4 h (fase exponencial) y 12 h (fase estacionaria) con cepas de <i>L. lactis</i> aisladas de vegetales determinada con la técnica ABTS. ....	55
<b>Tabla 9.</b> Capacidad antioxidante en leches fermentadas por 6 h (fase exponencial) y 10 h (fase estacionaria) con cepas de <i>L. lactis</i> aisladas de cultivos iniciadores comerciales determinada con la técnica ABTS.....	56
<b>Tabla 10.</b> Capacidad antioxidante en leches fermentadas por 6 h (fase exponencial) y 10 h (fase estacionaria) con cepas de <i>L. lactis</i> aisladas de cultivos iniciadores comerciales determinada con la técnica DPPH. ....	69

**Tabla 11.** Capacidad antioxidante en leches fermentadas por 4 h (fase exponencial) y 12 h (fase estacionaria) con cepas de *L. lactis* aisladas de vegetales determinada con la técnica DPPH..... 71

**Tabla 12.** Capacidad antioxidante en leches fermentadas por 2 h (fase exponencial) y 10 h (fase estacionaria) con cepas de *L. lactis* aisladas de productos lácteos artesanales determinada con la técnica DPPH..... 72

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema general de la formación de EROs y ERN .....	5
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de oxidación de lípidos.....	7
<b>Figura 3.</b> Capacidad antioxidante de las diferentes fracciones de la caseína bovino. ....	21
<b>Figura 4.</b> Curvas de crecimiento de dos cepas de <i>L. lactis</i> (30°C, 16 h) aisladas de productos lácteos artesanales.....	43
<b>Figura 5.</b> Curvas de crecimiento de dos cepas de <i>L. lactis</i> (30°C, 16 h) aisladas de cultivos iniciadores comerciales. ....	44
<b>Figura 6.</b> Capacidad acidificante de cepas de <i>L. lactis</i> inoculadas en leche en diferentes períodos de tiempo (h). ....	46
<b>Figura 7.</b> Curva de calibración del TROLOX para la técnica del ABTS. ....	52
<b>Figura 8.</b> Actividad antioxidante de los extractos acuosos provenientes de leches fermentadas con <i>L. lactis</i> aisladas de lácteos artesanales en la fase de crecimiento exponencial utilizando la técnica ABTS. ....	59
<b>Figura 9.</b> Actividad antioxidante de los extractos acuosos provenientes de leches fermentadas con <i>L. lactis</i> aisladas de lácteos artesanales en la fase de crecimiento estacionaria utilizando la técnica ABTS.....	60
<b>Figura 10.</b> Actividad antioxidante de los extractos acuosos provenientes de leches fermentadas con <i>L. lactis</i> aisladas de vegetales en la fase de crecimiento exponencial utilizando la técnica ABTS. ....	61
<b>Figura 11.</b> Actividad antioxidante de los extractos acuosos provenientes de leches fermentadas con <i>L. lactis</i> aisladas de vegetales en la fase de crecimiento estacionaria utilizando la técnica ABTS.....	62

<b>Figura 12.</b> Actividad antioxidante de los extractos acuosos provenientes de leches fermentadas con cepas de <i>L. lactis</i> aisladas de cultivos iniciadores comerciales en fase de crecimiento exponencial utilizando la técnica ABTS.....	63
<b>Figura 13.</b> Actividad antioxidante de los extractos acuosos provenientes de leches fermentadas con <i>L. lactis</i> aisladas de cultivos iniciadores comerciales en la fase de crecimiento estacionaria utilizando la técnica ABTS.....	64
<b>Figura 14.</b> Curva de calibración del TROLOX para la técnica DPPH.	67
Figura 15. Actividad antioxidante de los extractos acuosos provenientes de leches fermentadas con <i>L. lactis</i> aisladas de cultivos iniciadores comerciales utilizando la técnica DPPH. ....	74
<b>Figura 16.</b> Actividad antioxidante de los extractos acuosos provenientes de leches fermentadas con <i>L. lactis</i> aisladas de productos lácteos artesanales utilizando la técnica DPPH. ....	75
<b>Figura 17.</b> Actividad antioxidante de los extractos acuosos provenientes de leches fermentadas con <i>L. lactis</i> aisladas de vegetales utilizando la técnica DPPH. ....	76

## RESUMEN

Diferentes estudios han mostrado que las especies reactivas al oxígeno y al nitrógeno, así como los radicales libres son promotores de numerosas enfermedades degenerativas como el cáncer, mal de Alzheimer y Parkinson. Los péptidos con capacidad antioxidante son capaces de disminuir el riesgo de acumulación de radicales libres durante la ingestión de alimentos, ya que son hábiles para degradar el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno. Una de las formas de producir péptidos con capacidad antioxidante es a través de la fermentación de la leche por bacterias ácido lácticas (BAL) como *Lactococcus lactis* (*L. lactis*), ya que su sistema proteolítico desdobla las proteínas de la leche liberando péptidos bioactivos. En el presente estudio se obtuvieron extractos acuosos a partir de leches fermentadas con cepas de *L. lactis* en dos fases de crecimiento (exponencial y estacionaria). Los extractos completos obtenidos fueron fraccionados por peso molecular (10-3 y  $\leq 3$  kDa) para ensayar su capacidad antioxidante *in vitro*. La evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos acuosos se determinó por el método TEAC (capacidad antioxidante expresada como equivalentes de Trolox), utilizando como radical catión 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonatodiamonio) ( $ABTS^{\bullet+}$ ) y 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH $^{\bullet}$ ). Las cepas de *L. lactis* aisladas de diferentes ecosistemas (lácteos artesanales, vegetales y cultivos iniciadores comerciales) mostraron capacidad antioxidante *in vitro* en diferentes niveles. La capacidad antioxidante asociada a los péptidos presentes en los extractos acuosos derivados de las leches fermentadas, estuvo en función del ecosistema de aislamiento ( $p < 0.05$ ). En términos generales, la tendencia mostró que los extractos acuosos provenientes de leches fermentadas con cepas aisladas de lácteos artesanales (1,620  $\mu$ M TROLOX) presentaron mayor capacidad antioxidante, seguida de los vegetales (1,368  $\mu$ M TROLOX) y por

último los cultivos iniciadores comerciales (1,015  $\mu$ M TROLOX). La capacidad antioxidante asociada a los péptidos presentes en los extractos acuosos fue debida a las fracciones de peso molecular obtenidas ( $\leq 3$  kDa) y a la fase de crecimiento bacteriano (estacionaria) asociada a la fermentación de leche. Esto es de gran interés, ya que los péptidos antioxidantes confieren un valor agregado a los lácteos fermentados por sus beneficios a la salud.



## I. INTRODUCCIÓN

La nutrición humana está asociada con el metabolismo oxidativo durante la producción de energía y otras reacciones bioquímicas celulares (Coskun *et al.*, 2009). El metabolismo oxidativo se origina cuando hay niveles altos de radicales libres, especies reactivas al oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) (Virtanen *et al.*, 2006), que se forman por reacciones puramente químicas, por acción enzimática o por efecto de radiaciones ionizantes. La exposición a estas especies reactivas trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en prácticamente cualquier órgano o sistema; por lo que se reconoce como mecanismo general de daño celular.

El cuerpo humano cuenta con su propio sistema de defensa y es capaz de inactivar o remover los radicales libres por acción enzimática o no enzimática. El sistema enzimático incluye la acción antioxidante de la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa, mientras que el no enzimático está compuesto por moléculas de bajo peso molecular como glutatión, ácido úrico, tocoferoles, ácido ascórbico, polifenoles y péptidos antioxidantes. Dichas moléculas pueden tener origen endógeno o ser incorporados a través de la dieta, en este último, muchas proteínas alimentarias (soya, maíz, papa, trigo, gelatina, huevo, frijol, carne, pescado y leche) poseen encriptados en sus secuencias, péptidos con capacidad antioxidantes, que pueden ser liberados por reacciones de hidrólisis llevadas a cabo por las enzimas digestivas durante el tránsito gastrointestinal y/o durante el procesamiento de alimentos, como la fermentación (Veneréo, 2002).

De particular interés son las proteínas de la leche, ya que han sido reportados con capacidad de liberar péptidos con actividad biológica (opiácea, citoimmunomoduladores, antimicrobianos, anticarcinogénicos y antioxidantes)

mediante un proceso natural que ocurre con la ayuda de las enzimas endógenas de la leche y con enzimas microbianas, especialmente las provenientes de las BAL, utilizadas como cultivos iniciadores durante la fabricación de productos lácteos fermentados y maduración de quesos (Gobbetti *et al.*, 2002).

Se ha establecido previamente que la producción de péptidos bioactivos se ve afectada tanto por la manipulación de las condiciones de crecimiento, como por la capacidad proteolítica de las BAL o sus enzimas. Sin embargo, un aspecto que aún no ha sido explorado, es si la variedad de los ecosistemas de aislamiento, podría interactuar en la producción de péptidos bioactivos con capacidad antioxidante por las BAL; esto último es de gran importancia tecnológica dada la posibilidad de poder obtener lácteos fermentados con mayor capacidad antioxidante. En base a lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar si las cepas de *Lactococcus lactis* aisladas de diversos ecosistemas producen péptidos con capacidad antioxidante al inocularlos en leche, lo cual permitirá la selección para su empleo como componentes en la elaboración de alimentos funcionales.

## II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

### 2.1. Estrés Oxidativo

Los elementos vitales requeridos por las células para su funcionamiento normal son el oxígeno y el nitrógeno. Durante el metabolismo de estas sustancias pueden generarse componentes altamente reactivos denominados ERO y ERN (Vargas *et al.*, 2007). Por otra parte, también pueden generarse radicales libres a partir de fuentes exógenas, inducidos por factores como las radiaciones ionizantes, las ultravioleta, drogas antitumorales, algunos productos químicos carcinogénicos, agentes contaminantes, pesticidas, humo de cigarro, así como ciertos medicamentos (González-Torres *et al.*, 2000).

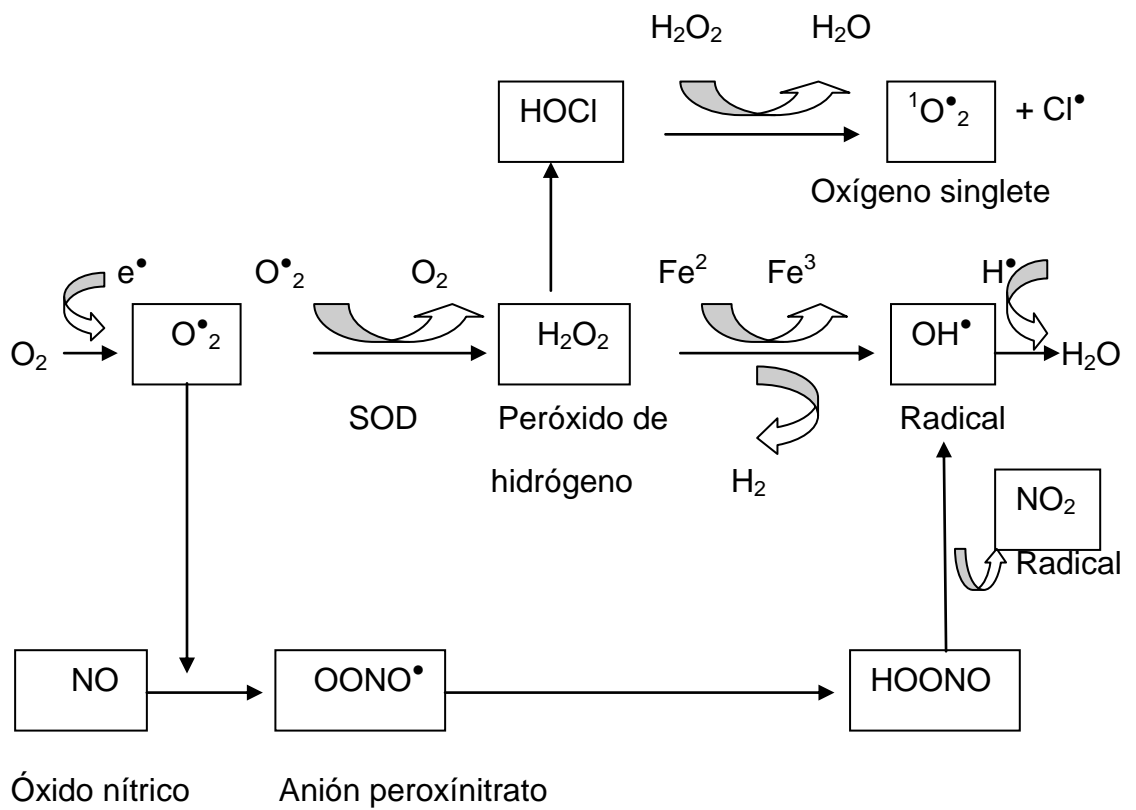
Desde el punto de vista químico, los radicales libres son especies químicas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado en la capa externa, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad, por lo que éste intenta indiscriminadamente recuperar su electrón a través de otros átomos. Así, los radicales libres reaccionan con biomoléculas como proteínas y lípidos, causando daño celular por la peroxidación de lípidos de la membrana, inactivación de las enzimas sulfhidrilas, ligazón entrecruzada de proteínas o ruptura del ADN, provocando reacciones en cadena que pueden causar daños biológicos. La pérdida de electrones de moléculas se conoce como oxidación, mientras que cuando las moléculas recuperan electrones se conoce como reducción (Challem y Block, 2008).

Aunque las reacciones de oxido-reducción son necesarias para un adecuado funcionamiento celular, un desequilibrio entre la producción de especies reactivas y los mecanismos antioxidantes, genera estrés oxidativo y muerte celular (Lozada y García, 2009). Además, el estrés oxidativo juega un papel significativo en diversos padecimientos como la diabetes, Alzheimer,

artritis reumatoide, epilepsia, enfermedad de Huntington, mal de Parkinson, envejecimiento y cáncer los cuales están asociadas al exceso de radicales libres que se encuentran en el organismo (Yuh-Hwa *et al.*, 2010).

Las ERO y ERN son moléculas muy reactivas, estas se dividen en: radicales libres y en no radicales. Dentro de los radicales libres encontramos como los más importantes al anión superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), que es el radical más abundante; el radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), el más tóxico entre los radicales; radical peróxil ( $ROO^{\bullet}$ ) y el óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ). Dentro de las moléculas no radicales que son más estables se encuentran el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), semiquinona (Q), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el peroxinitrito (ONOO), una molécula que puede generar a largo plazo un efecto tóxico; el anión nitróxi (NO), dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ), entre otras (Vargas *et al.*, 2007; Lozada y García, 2009). Existen números mecanismos por los cuales se generan las EROs (Figura 1), como en las mitocondrias, retículo endoplasmático, linfocitos y neutrófilos, entre otros (Vargas *et al.*, 2007).

La oxidación es un proceso fisiológico que no se puede evitar ya que constantemente se producen EROs y ERN en el organismo (Lozada y García, 2009). Por ejemplo, durante mucho tiempo se ha creído que altos niveles de LDL con respecto al HDL eran una causa importante para el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares; sin embargo, se ha demostrado que las modificaciones del LDL por efectos de la oxidación es la pieza clave que produce aterogénesis (Challem y Block, 2008). También, las EROs y ERN están involucradas con el envejecimiento celular ya que se estima que 10,000 interacciones oxidativas ocurren entre el ADN y los radicales libres, y por lo menos una de cada tres proteínas es disfuncional por estrés oxidativo en los animales de edad avanzada (Vargas *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Esquema general de la formación de EROs y ERN (Vargas *et al.*, 2007).

## 2.2. El Deterioro de los Lípidos

La oxidación no sólo ocurre en los seres vivos, también ocurre en los alimentos. Las grasas y los aceites son los principales lípidos que se encuentran en los alimentos, contribuyendo en forma general al sabor y a las propiedades sensoriales en su conjunto. El deterioro de los aceites y grasas se presenta debido a la oxidación de los ácidos grasos insaturados. Los aceites sufren transformaciones químicas, como la rancidez, que además de reducir su valor nutritivo, producen compuestos volátiles que imparten olores y sabores desagradables (Badui, 2006). Dichas transformaciones, pueden ser causadas por reacciones de fotosensibilidad, por enzimas derivadas del metabolismo de microorganismos, por altas temperaturas, por presión alta de oxígeno y por la oxidación de los ácidos grasos insaturados que forman EROs (Min y Boff, 2002).

El mecanismo por el cual se forman los radicales libres y se oxidan los alimentos se muestra en la Figura 2, como puede observarse, los hidroperóxidos formados en la oxidación de los lípidos son altamente reactivos y producen nuevos radicales libres que alimentan la reacción e interaccionan con otras moléculas, además se polimerizan e incrementa la viscosidad, se oxidan, sintetizan epóxidos, su ruptura genera aldehídos, cetonas, ácidos y compuestos de bajo peso molecular que confieren olores (Badui, 2006). La oxidación en los alimentos baja el valor nutricional, produce indeseables sabores y reduce la vida de anaquel, lo que hace que el alimento sea poco aceptable o incluso inaceptable para el consumidor (Min y Boff, 2002).

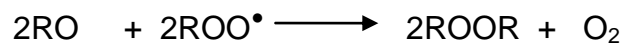
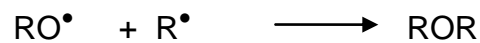
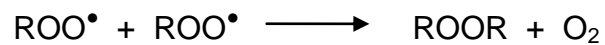
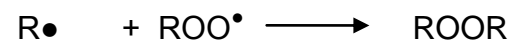
Iniciación



Propagación



Terminación



**Figura 2.** Mecanismo de oxidación de lípidos (Pokorny *et al.*, 2001; Badui, 2006). RH: ácido graso insaturado.

### 2.3. Reducción de los Radicales Libres en los Seres Vivos e Inhibición de la Oxidación de Lípidos

Se ha demostrado en diversos estudios que las personas que tienen una dieta rica en frutas y vegetales sobreviven más tiempo, esto se debe a la gran cantidad de agentes antioxidantes que poseen estos alimentos (Philanto *et al.*, 2006). Por ejemplo, en China se realizó un estudio con 30,000 sujetos, que demostró una reducción significativa en desarrollo de cáncer de estómago en los individuos que ingirieron regularmente antioxidantes (Blot *et al.*, 1993). Un estudio realizado por la OMS mostró una correlación inversa entre los niveles de la vitamina E y la mortalidad por infarto al miocardio en 16 ciudades europeas. Las investigaciones en este campo han determinado que la presencia excesiva de radicales libres en relación a la cantidad de antioxidantes, desempeña un papel fundamental en el desarrollo de ciertas enfermedades relacionadas con la edad y el proceso de envejecimiento (Challem y Block, 2008).

Los antioxidantes son toda sustancia que hallándose presentes a bajas concentraciones con respecto al sustrato oxidable (biomolécula), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato, cediendo a los radicales libres un electrón y transformándose en un radical libre débil no tóxico. Los antioxidantes frenan la reacción de oxidación, pero a costa de destruirse ellos mismos, es decir, la utilización de antioxidantes resulta en el retraso de la alteración oxidativa del alimento, más no la evita de forma definitiva (Díaz-Ambrona *et al.*, 2004).

Los antioxidantes se usaron por primera vez en la segunda guerra mundial para conservar los alimentos. Los primeros antioxidantes fueron sustancias



naturales que fueron sustituidas por sustancias sintéticas, ya que son más baratos, de mayor pureza y con actividad antioxidante más uniforme (Díaz-Ambrona *et al.*, 2004). Los antioxidantes sintéticos más usados en alimentos son butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), propilgalato (PG) y ter-butilhidroquinona (TBHQ) que pueden ser agregados en diferentes dosis, de acuerdo a las regulaciones internacionales. Por solo citar un ejemplo, el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile permite hasta 200 mg/kg de BHA y TBHQ y hasta 100 mg/kg de BHT y PG (GRANOTEC, 2002). Sin embargo, el uso de antioxidantes sintéticos como los mencionados datan de hace 60 años cuando el BHA fue aprobado (GRANOTEC, 2002).

Recientemente, la seguridad alimentaria de ciertos antioxidantes sintéticos está siendo cuestionada debido a que se ha demostrado que algunos de ellos pueden ser tóxicos a dosis elevadas, presentando un potencial efecto cancerígeno, un claro ejemplo es el BHA al cual se ha retirado al status GRAS (generalmente reconocido como seguro). Esto ha generado gran interés por parte de la industria, así como de los consumidores, por encontrar nuevas alternativas naturales para reemplazar dichos antioxidantes sintéticos (GRANOTEC, 2002).

Los antioxidantes naturales son considerados como compuestos GRAS y pueden ser clasificados en endógenos y exógenos (Veneréo, 2002). La Tabla 1 muestra un resumen de esta clasificación. Los antioxidantes naturales más importantes en los alimentos son: la vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles), molécula de naturaleza liposoluble que inactiva a los radicales libres, ya que actúan en la etapa de propagación en la oxidación de los lípidos; la vitamina C o ácido ascórbico, el antioxidante hidrosoluble más potente; el glutatión, el antioxidante biológico más importante sintetizado en el citoplasma y los flavonoides (compuestos fenólicos) que neutralizan el oxígeno singlete (Díaz-Ambrona *et al.*, 2004).

**Tabla 1.** Clasificación de los antioxidantes naturales

<b>Clasificación</b>	<b>Acción</b>
<b>1. Exógenos</b>	
Vitamina E	Neutralizan el oxígeno singlete y peróxidos. Capturan radicales hidroxilo
Vitamina C	Neutralizan el oxígeno singlete y peróxidos. Capturan radicales hidroxilos Regeneran la forma oxidada de la Vitamina E
Betacarotenos y Flavonoides	Neutralizan el oxígeno singlete
Péptidos Antioxidantes	Degradan el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno.
<b>2. Endógenos enzimáticos</b>	
Glutación peroxidasa	Cofactores
Superóxido diminutasa	Selenio
Catalasa	Cobre, sodio
	Hierro
<b>3. Endógenos no enzimáticos</b>	
Glutación	Actúan como barreras fisiológicas desde la entrada del oxígeno al cuerpo hasta que llega a la célula
Coenzima Q	

(Veneréo, 2002).

Lo anterior pone de manifiesto, la importancia de buscar nuevos antioxidantes naturales que sean mejores que los antioxidantes sintéticos para inhibir la oxidación de los lípidos previniendo que los alimentos se deterioren y no sean nocivos. Además, de formular alimentos con el fin de aumentar la concentración de agentes antioxidantes que coadyuven a prevenir el desarrollo de ciertas enfermedades causadas por el estrés oxidativo (Challem y Block, 2008).

### **2.3.1. Alimentos Funcionales**

El acelerado estilo de vida del ser humano ha generado importantes cambios en materia alimentaria a nivel mundial. Los nuevos, y algunas veces, poco saludables hábitos alimenticios de la población, junto con el sedentarismo y el estrés, inducen incremento del daño oxidativo. En busca de una respuesta a disminuir el estrés oxidativo y gracias a los avances científicos y al desarrollo tecnológico, actualmente se pretende fomentar el consumo de alimentos que más allá de sus funciones nutricionales básicas, aporten beneficios extras a la salud y bienestar de la población (Sarmiento-Rubiano, 2006). Se considera que un alimento es funcional (AF), si se ha demostrado de manera satisfactoria que posee un efecto beneficioso sobre una o varias funciones en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, siendo esto relevante para la mejora de la salud o en una disminución del riesgo de sufrir enfermedades (Vidal-Carou, 2008).

Un AF contiene un componente, nutriente o no nutriente, con actividad selectiva relacionada con una o varias funciones del organismo, con un efecto fisiológico añadido por encima de su valor nutricional y cuyas acciones positivas justifican que pueda reivindicarse su carácter funcional (fisiológico) o incluso saludable. Un alimento funcional puede serlo para toda la población o sólo para

un grupo específico. Estos alimentos abarcan macro-nutrientes con efectos fisiológicos concretos (almidón, ácidos grasos omega 3, entre otros) y micronutrientes esenciales con ingestas necesariamente superiores a las recomendaciones dietéticas diarias. Los AF debe seguir siendo en todo momento un alimento; es decir, es necesario que ejerza sus efectos beneficiosos consumido como tal, dentro de una dieta convencional y en la cantidad en que habitualmente es ingerido (Silveria-Rodríguez *et al.*, 2003; Vidal-Carou, 2008).

Los AF representan un mercado amplio y en franco crecimiento, que se desarrolla en paralelo a los avances en nutrición y tecnología alimentaria y a una comprensión cada vez mayor por parte de los consumidores preocupados por su dieta y su salud (Niva, 2007). Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de regular legalmente a los alimentos funcionales, ya que actualmente no están regulados. Una clasificación propuesta ha sugerido su clasificación de acuerdo a lo siguiente:

- Probióticos: microorganismos vivos que al administrarse en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud al huésped. Las bacterias ácido lácticas, entre las que se encuentra *Lactobacillus spp.* pueden ejercer una función doble, actuando como agentes fermentadores de alimentos, pudiendo además generar efectos benéficos a la salud (Fedorak y Madsen, 2004)
- Prebióticos: son sustancias alimenticias (oligofructosa, inulina, galacto-oligosacáridos, entre otros) que nutren a un grupo selecto de microorganismos que pueblan el intestino (Fedorak y Madsen, 2004).
- Simbióticos: son combinaciones apropiadas de pre y probióticos (Fedorak y Madsen, 2004)

- Péptidos bioactivos: son secuencia de aminoácidos con actividades fisiológicas que se encuentran encriptados en las proteínas de origen animal y vegetal (Silveria-Rodríguez *et al.*, 2003).
- Ácidos grasos: forman parte de los fosfolípidos y glucolípidos, moléculas que constituyen la bicapa lipídica de todas las membranas celulares, además son precursores de las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, moléculas con una gran actividad biológica, que intervienen en la regulación y control de numerosos procesos vitales, como la respuesta inflamatoria, regulación de la temperatura corporal, procesos de coagulación sanguínea, contracción del músculo liso, entre otros (Silveria-Rodríguez *et al.*, 2003).

Con el desarrollo de los AF la relación alimentos-salud toma la dimensión no de medicamentos, sino de productos para la prevención de enfermedades, siendo los lácteos los más comunes en el mercado como vehículos de elementos para disminuir el riesgo de desarrollo de ciertos padecimientos. El futuro de los AF es fácilmente predecible pues la preocupación por la salud conlleva al aumento de la demanda de este tipo de productos por parte de los consumidores (Silva-Hernández y Verdalet, 2003). Depende de los gobiernos diseñar las políticas para fomentar la investigación científica y la producción de nuevos alimentos o componentes alimenticios con propiedades funcionales, teniendo en cuenta que podrían ser una importante alternativa para contribuir a mejorar la calidad de vida en la población (Sarmiento-Rubiano, 2006).

### **2.3.2. Componentes Bioactivos de la Leche**

La leche y sus derivados contienen diversos componentes con actividad fisiológica como los ácidos grasos, hormonas, factores de crecimiento, mucinas y péptidos endógenos. Algunos de estos componentes bioactivos ya están siendo utilizados en algunos productos comerciales, como por ejemplo la peroxidasa en pasta dental para evitar la caries y la lactoferrina en fórmulas infantiles como agente antibacterial. Además, algunos derivados de la leche son importantes fuentes de nutrimentos como las proteínas del suero de quesería por su alto valor nutricional, pero también por sus variadas propiedades funcionales que poseen al adicionarse como ingredientes a otros productos alimenticios (Sarmiento-Rubiano, 2006).

La gran variedad de constituyentes que se encuentran en la leche como las proteínas, lípidos, vitaminas, polifenoles minerales, carbohidratos e incluso derivados de éstos, hace que la leche además de nutrir tenga un efecto benéfico a la salud (Silva y Verdalet, 2003). Gracias a las técnicas de separación en la industria láctea aunado a la tecnología enzimática, se pueden separar, concentrar ó modificar los compuestos de la leche, lo que permite ser aplicado como AF (Séverin y Wenshui, 2005).

Existen otros componentes lácteos que podrían ser empleados en los alimentos funcionales, como lo son los péptidos bioactivos derivados de leche fermentada. El calificativo de “bioactivo” es comúnmente utilizado para describir péptidos con diversos tipos de actividad biológica. La gran diversidad de péptidos encontrados en la leche es debido a su contenido proteico (Torres-Llana *et al.*, 2005). La leche tiene dos grupos principales de proteínas: las

caseínas y las proteínas séricas. Las caseínas representan alrededor del 80% del contenido total de proteína de la leche bovina y se subdividen en  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseínas. Las proteínas séricas se componen de  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina, inmunoglobulinas (IgG), glicomacropéptidos, albúmina sérica bovina y otras en menor proporción, como lactoperoxidasa, lisozima y lactoferrina (Baró *et al.*, 2001; Torres-Llanez, *et al.*, 2005). Los péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche ejercen un beneficio a la salud adicional de su valor nutricional (Segura-Campos *et al.*, 2010a).

Los péptidos derivados pueden alterar el metabolismo celular y actuar como hormonas o neurotransmisores, jugando un papel fisiológico importante a través de interacciones hormona-receptor y cascadas de señalización. También ejercen su acción sobre la regulación del metabolismo (agua, minerales y otros nutrientes) controlando las glándulas de excreción (Wang y González de Mejía, 2005). Existe evidencia considerable de que muchos péptidos bioactivos, derivados de las proteínas de la leche, tienen capacidad multifuncional (Tabla 2) (Yuleivys y Vega, 2004).

Generalmente, los péptidos derivados de la leche están inactivos dentro de la secuencia de la proteína precursora y pueden ser liberados y activados mediante la proteólisis enzimática, por ejemplo durante la digestión gastrointestinal o en el procesamiento de los alimentos, sirviendo así como fuente de péptidos bioactivos (Yuleivys y Vega, 2004; Haque y Rattan, 2006). Los péptidos bioactivos liberados pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica ejerciendo funciones específicas a nivel local, tracto gastrointestinal y a nivel sistémico (Segura-Campos *et al.*, 2010b).

**Tabla 2.** Péptidos con actividad biológica derivados de las proteínas de la leche.

Proteína precursora	Péptidos bioactivos y su secuencia	Función
$\alpha$ - y $\beta$ - caseína	Péptidos inmunomoduladores	Estimulan la respuesta inmune, son reguladores de la proliferación celular
$\beta$ - y $\kappa$ -caseína	Péptidos hipotensores Val-Pro-Pro Ile-Pro-Pro	Inhibidores de la enzima convertidora angiotensina
$\kappa$ -caseína, lactoferrina	Péptidos antitrombóticos	Inhiben la agregación de las plaquetas
$\beta$ -, $\alpha$ - Caseínas	Péptidos quelantes: Caseinofosfopéptidos -Ser (P)-Ser (P)-Ser (P)- Glu-Glu	Mejoran la absorción de minerales y metales
Lactoferrina, $\beta$ -lactoglobulina, $\alpha$ -lactalbúmina y $\kappa$ -caseína	Péptidos opioides Try-Leu-Gly-Ser-Gly-Try (-OCH <sub>3</sub> )	Actividad opioide (regulación de la actividad gástrica y pancreática; regulación del tránsito intestinal)
$\kappa$ -caseína	Péptidos antioxidantes	Capacidad secuestradora de los radicales libres.
Lactoferrina	Péptidos antimicrobianos	Sistema de defensa ante enfermedades e infecciones virales

(Shah, 2000; Kitts y Weiler, 2003)



La mayor parte de las proteínas son absorbidas como péptidos y no como aminoácidos libres (Baró *et al.*, 2001). La mayoría de los péptidos de más de tres aminoácidos son hidrolizados extracelularmente por las enzimas. Se ha observado que los polipéptidos grandes o resistentes a la proteólisis pueden entrar en la circulación sanguínea en pequeñas cantidades debido a que sus grupos amino terminales están bloqueados (Picariello *et al.*, 2010). Mientras que los dipéptidos y tripéptidos pueden ser absorbidos intactos. Las dipeptidasas y tripeptidasas pueden posteriormente hidrolizar estos péptidos a aminoácidos; se ha sugerido que algunos de éstos pueden escapar al ataque enzimático y alcanzar intactos la circulación sanguínea (Baró *et al.*, 2001).

A pesar de que los péptidos tienen grandes beneficios para la salud. Existen estudios que han puesto de manifiesto que algunos péptidos pueden representar un riesgo para su salud de individuos sensibles a ciertos alérgenos alimenticios, ya que el péptido al ser liberado de la proteína podía presentar una parte alergénica (Picariello *et al.*, 2010). Sin embargo, otros estudios realizados indican que los péptidos menores a 1000 Da, a los que pertenecen los péptidos bioactivos, no producen alergias (Guadix *et al.*, 2000).

#### 2.4. Péptidos Antioxidantes

Los péptidos con capacidad antioxidante derivados de la hidrólisis de las proteínas alimentarias son compuestos seguros y saludables; son de bajo peso molecular (5-16 aminoácidos), de alta actividad antioxidante y son fácilmente absorbidos en el intestino. A diferencia de los antioxidantes enzimáticos, los péptidos antioxidantes tienen una estructura simple que permite que sean más

estables y no generan inmuno-reacciones (Sarmadi e Ismail, 2010). Además los péptidos antioxidantes son capaces de regenerarse por la acción de otros antioxidantes. Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado radical libre o hacia varios (Rodríguez-Perón *et al.*, 2001).

De acuerdo a Halliwell y Gutteridg (1998) y a Blokhina *et al.* (2003), los mecanismos de acción de los péptidos antioxidantes incluyen: (a) supresión de la formación de especies reactivas, ya sea por la inhibición de enzimas o como quelantes eliminando las trazas de ciertos metales, como el cobre o el hierro, que facilitan la oxidación, (b) eliminación del oxígeno atrapado o disuelto en el producto y (c) deteniendo la reacción en cadena de oxidación de las grasas.

#### **2.4.1. Características de los Péptidos Antioxidantes**

La actividad antioxidante de los péptidos con actividad biológica es atribuida a la secuencia de los aminoácidos que los conforman (Hogan *et al.*, 2009). Por ejemplo: los aminoácidos con grupos aromáticos como la tirosina, fenilalanina y triptófano, así como, aminoácidos que contienen grupos sulfuros como la cisteína, tienen el potencial de donar protones a los radicales libres (Sadat *et al.*, 2011). Además, los aminoácidos de carácter básico, lisina y arginina, y aminoácidos de carácter ácido, aspartato y glutamato, ejercen actividad antioxidante quelando iones metálicos. Se han reportado que los aminoácidos de carácter básico, como la histidina, tiene la habilidad tanto del secuestro del radical como en la quelación de metales, dado a que en su estructura tiene un anillo imidazol (Arcan y Yemeniciog, 2007; Sarmadi e Ismail, 2010).

La actividad antioxidante depende de la posición en la que se encuentren los aminoácidos que componen a los péptidos, por ejemplo: péptidos que tengan prolina en la posición N-terminal de su cadena, tienen mayor poder antioxidante en el control de la oxidación del ácido linoleico, que aquellos que tienen el aminoácido en la posición del C-terminal. Además, los péptidos que tienen como residuo a la histidina en la posición N-terminal muestran mayor actividad de quelación de metales, que aquellos péptidos que tienen histidina en la posición C-terminal (Virtanen *et al.*, 2006; Arcan y Yemeniciog *et al.*, 2007; Sarmadi e Ismail, 2010).

Adicionalmente, se ha reportado que existe una estrecha relación entre el carácter hidrofóbico de los aminoácidos y la actividad antioxidante de los péptidos (Sarmadi e Ismail, 2010). Por ejemplo, los péptidos de carácter hidrofóbico, se caracterizan por su capacidad para unirse y estabilizar los lípidos insaturados. Por otra parte, Hu *et al.* (2003), reportaron que los péptidos catiónicos demuestran una actividad antioxidante, ya que los grupos con carga positiva ayudan a la inhibición de la oxidación de los lípidos debido a la repulsión electrostática hacia los metales de transición. Por lo tanto, además de estabilizar los radicales libres y las actividades de captación de hierro, los péptidos parecen también prevenir la oxidación de lípidos mediante el aislamiento de los lípidos de los radicales libres e iones metálicos (Arcan y Yemeniciog *et al.*, 2007).

#### **2.4.2. Péptidos Antioxidantes en el Suero de la Leche**

En la actualidad, se han identificado péptidos derivados de la fermentación de la leche con capacidad secuestradora de radicales libres (Pihlanto-Leppala,

2006). Hernández-Ledesma *et al.* (2005), identificaron un decapeptido (Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ser-Asp-Ile) que tiene mayor actividad secuestradora de radicales que el butil-hidroxi-anizol (BHA), que es un poderoso antioxidante. En la Figura 3 se muestra la capacidad de péptidos bioactivos para secuestrar radicales libres antes y después de la hidrólisis enzimática con pepsina y tripsina en leche de ovino con diferentes fracciones de la caseína utilizando el método TEAC (capacidad antioxidante en equivalentes TROLOX) basado en la cuantificación de TROLOX, un antioxidante análogo de la vitamina E (Gómez-Ruíz *et al.*, 2008).

Estudios previos han revelado que la proteína láctica,  $\kappa$ -caseína, puede liberar péptidos antioxidantes a partir de la fermentación de leche por bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Kudoh *et al.*, 2001)

## 2.5. Producción de Péptidos Antioxidantes Empleando Fermentos Microbianos

Se han utilizado tres estrategias fundamentales para la identificación y caracterización de péptidos bioactivos: el aislamiento a partir de hidrolizados enzimáticos, el procesamiento de alimentos a través de las fermentaciones lácticas y/o hidrolizados gastrointestinales *in vivo* de las proteínas precursoras. El sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas (BAL) es responsable de la obtención de péptidos a partir de las caseínas de la leche ya que requieren de la presencia de algunos aminoácidos esenciales para su crecimiento (Jensen y Hammer, 1993, Teuber y Geis, 2006).

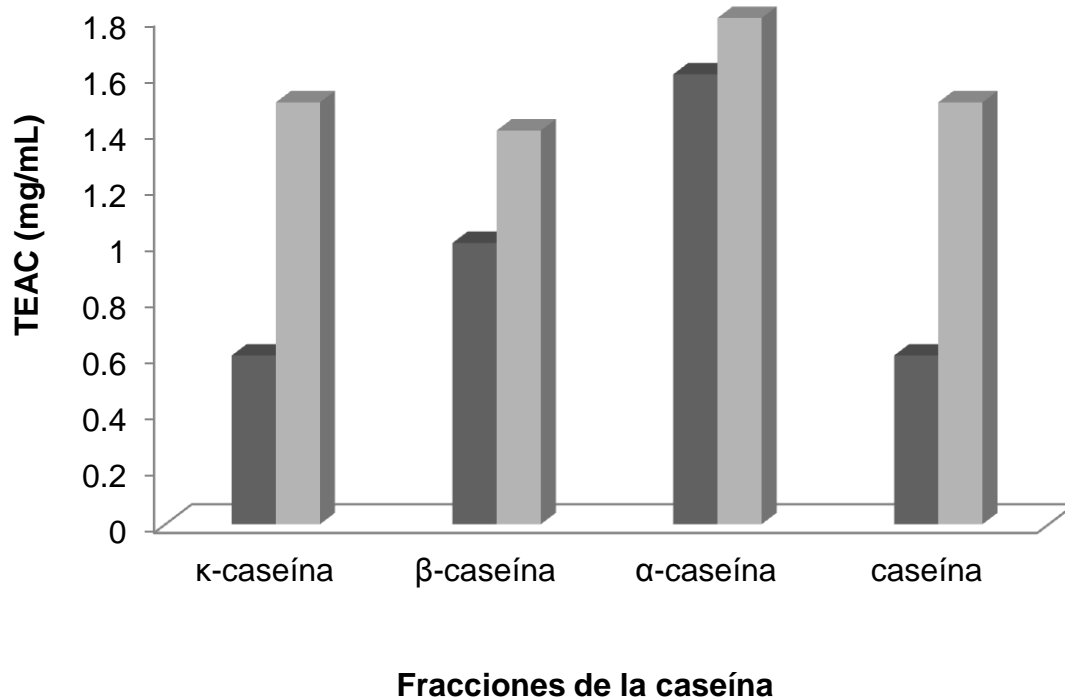


Figura 3. Capacidad antioxidante de las diferentes fracciones de la caseína bovino. Capacidad antioxidante en equivalentes TROLOX (TEAC) de los péptidos bioactivos para secuestrar radicales libres antes (barras claras) y después (barras oscuras) de ser hidrolizados por enzimas tripsina y pepsina (Gómez-Ruiz *et al.*, 2008).

Las BAL constituyen un grupo de bacterias gram positivas, no esporuladas, inmóviles, que por su morfología pueden ser cocos ó bacilos (Dekker, 2004). Estos microorganismos se adaptan a condiciones ambientales que ofrece el sustrato y son capaces de controlar y sobreponerse a la microbiota alterante de los productos. Por lo tanto, estos microorganismos se encuentran en diversos productos alimenticios como yogurt, jocoque, quesos madurados, productos cárnicos y en algunas hortalizas (Gobbetti *et al.*, 2005).

En la industria láctea se utilizan como cultivos iniciadores las BAL debido a que tienen la capacidad de generar ciertos olores y sabores deseables en los alimentos a través del proceso de fermentación (Ayad *et al.*, 2000). Además, los péptidos bioactivos son generados por las BAL que son utilizadas como cultivos iniciadores en productos fermentados de la leche. La selección del cultivo para la generación de altas concentraciones de péptidos debe ser en función a la actividad proteolítica de la bacteria, de lo contrario puede destruirse el producto (Hajirostamloo, 2010). Algunas BAL generadoras de péptidos bioactivos son *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Leuconostoc mesenteroides ssp.*, *Lactococcus lactis* y *Bifidobacterium* (Virtanen *et al.*, 2006).

Las cepas de *Lactococcus lactis* son consideradas cultivos multifuncionales debido a que producen bacteriocinas, actúan como conservantes naturales debido a su acción antimicrobiana, generan compuestos aromáticos (Leroy y De Vuyst, 2006). La demanda por parte de los consumidores de generar alimentos con características funcionales ha motivado la búsqueda de diferentes cepas de *Lactococcus lactis* (Topisirovic *et al.*, 2007).

## 2.6. *Lactococcus lactis* (L. lactis)

Las bacterias del género *Lactococcus* son uno de los miembros más importantes del grupo de las BAL. *L. lactis* es una bacteria gram positiva, aerobia, no esporulada e inmóvil. Se pueden distinguir tres subespecies de *L. lactis*: *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris* y *L. lactis* ssp. *lactis* *hordniae*. De las cuales sólo las dos primeras son importantes en la fabricación de productos lácteos (Prodelalová *et al.*, 2005).

Las especies de *L. lactis* son generalmente reconocidas como seguras (GRAS) para el consumo humano. En los últimos años, la fisiología, bioquímica, genética y la biología molecular de la *Lactococcus* han atraído la atención, debido a su gran importancia económica (Teuber, 1995). Los ecosistemas ambientales donde se han localizado a *Lactococcus* son: maíz, frijol blanco, repollo, lechuga, guisantes, salvado de trigo, pasto, trébol, patatas, pepinos, y melones. Los principales ecosistemas de *L. lactis* ssp. *cremoris* son leche, fermentos lácticos y queso (Teuber y Geis, 2006).

Las funciones bioquímicas y tecnológicas de *Lactococcus* necesarias para la fermentación de la leche y la producción de queso se dan por la formación de ácido láctico a partir de la fosforilación de la lactosa durante el transporte a través de una fosfotransferasa específica, unida a la membrana del sistema (Teuber y Geis, 2006). Además, las bacterias ácido lácticas son nutricionalmente exigentes, todas ellas requieren medios complejos para un óptimo crecimiento. En un medio sintético, todas las cepas de *Lactococcus* requieren aminoácidos como isoleucina, valina, leucina, histidina, metionina,

arginina y prolina, y vitaminas (niacina, pantotenato de calcio y biotina) para su crecimiento (Jensen y Hammer, 1993).

### **2.6.1. Sistema Proteolítico de *L. lactis***

Un estudio realizado por Visser y Groot-Mostert (1977), en distintas variedades de queso indican que es el sistema proteolítico de las bacterias lácticas es el principal responsable de la obtención de pequeños péptidos y aminoácidos a partir de las caseínas de la leche (Teuber y Geis, 2006). Para la degradación de las proteínas, *L. lactis* cuenta con un sistema proteolítico que consiste en enzimas como las proteinasas que se encuentran en la pared celular y un número de diferentes peptidasas intracelulares, incluyendo endopeptidasas, aminopeptidasas, tripeptidasas y dipeptidasas.

La mayoría de los estudios sobre las proteinasas de las BAL han sido realizados en el género *Lactococcus*. La localización de las proteinasas de diferentes cepas de *L. lactis* estudiadas es mayoritariamente extracelular; aunque también se ha descrito la existencia de proteinasas intracelulares. Las proteinasas extracelulares denominadas PrtP, son serina-proteinasa con un pH óptimo alrededor de 6.0, su actividad parece depender de la concentración de calcio y de la temperatura, y degradan a las proteínas de la leche como la caseína en oligopéptidos (Picon, 2010).

Las peptidasas intracelulares y extracelulares denominadas LEPI (hidroliza péptidos de 5-25 residuos), LEPII y LEPIII (hidrolizan sustratos de distintos tamaños) de los *Lactococcus* son metaloenzimas, responsables de la degradación de los oligopéptidos de cadena larga generando algunos péptidos bioactivos (Visser, 1993; Haque y Rattan, 2006). Éstos, por su diversidad y



multifuncionalidad, son componentes con actividades biológicas en los AF (Aleixandre *et al.*, 2005). La liberación de los péptidos con actividad biológica depende del sustrato, de la actividad proteolítica y de las condiciones del proceso, tales como la temperatura, pH y tiempo (Vioque y Millan, 2001b).

### **2.6.2. Leches Fermentadas con Cepas de *L. lactis***

En un estudio realizado por Virtanen *et al.* (2006), se demostró que a partir de la fermentación de la leche por cepas de *L. lactis* ssp. se generaban péptidos bioactivos con una capacidad antioxidante de un intervalo del 3 al 10%. De acuerdo con estos autores la cepa de BAL que se utilizaba para llevar a cabo la fermentación láctica va a depender la actividad antioxidante inhibitoria observada (Tabla 3).

Virtanen *et al.* (2006), encontraron que *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* B, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus jensenii* producen una alta proporción de péptidos antioxidantes, con un peso molecular de 4-20 kDa. Otras BAL, como *Lactococcus lactis* producen péptidos antioxidantes menores a los 4 kDa en leche fermentada. De acuerdo a lo anterior, la actividad proteolítica, y por lo tanto la generación de péptidos bioactivos, podría estar influenciada por la cepa.

Se ha demostrado que algunas cepas de *L. lactis* aisladas de diferentes ecosistemas, tales como cultivos iniciadores comerciales, productos lácteos artesanales y vegetales son buenas productoras de aroma, generan bacteriocinas y péptidos antihipertensivos (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2008; Reyes, 2010; Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2010). En un estudio se reportó que cepas de *L. lactis* aisladas de cultivos iniciadores, generan péptidos antioxidantes a partir de las proteínas de la leche (Virtanen *et al.*, 2006);

**Tabla 3.** Actividad antioxidante del suero de leches fermentadas de cepas de *L. lactis*

Cepa bacteriana	Actividad antioxidante (%)
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> A	10
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> B	9
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> A	9
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> B	3
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>biovar.</i> <i>diacetylactis</i> C	8
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>biovar.</i> <i>diacetylactis</i> D	6

(Virtanen *et al.*, 2006)

sin embargo, aún no hay estudios que demuestren que las cepas de *L. lactis* aisladas de diferentes ecosistemas como los vegetales, productos lácteos artesanales u otros cultivos iniciadores comerciales generen, a partir de la leche fermentada péptidos con capacidad antioxidante. Por lo anterior, es de interés saber si a partir de diferentes cepas de *Lactococcus lactis* aisladas de diversos nichos ecológicos podrán obtenerse péptidos con capacidad antioxidante, para ser utilizados como componentes funcionales.

## 2.7. Evaluación de la Capacidad Antioxidante

La evaluación *in vitro* de la capacidad antioxidante es aplicada como una rápida estimación de la posible actividad que un compuesto podría presentar *in vivo* o al formar parte del alimento. Existen numerosos métodos para evaluar la capacidad antioxidante *in vitro*, y según la reacción que involucran, pueden ser ensayos que incluyen reacciones en las que se transfiere un electrón (SET) y/o un átomo de hidrógeno (HAT) (McDonald-Wicks *et al.*, 2006; Sarmadi e Ismail, 2010).

Los ensayos basados en HAT usan un generador sintético de radicales libres, un sustrato oxidable utilizado como marcador y un antioxidante, generando una competencia entre el sustrato y el antioxidante por los radicales libres. Uno de los ensayos que se utilizan para evaluar HAT es el ORAC (Capacidad de Secuestrar el Radical de Oxígeno), TRAP (Capacidad Antioxidante Total), entre otros (McDonald-Wicks *et al.*, 2006).

Los ensayos enfocados en SET se basan en reacciones de reducción, en la que el sustrato oxidable agarra un electrón del compuesto antioxidante causando un cambio de color que se utiliza como medida para la determinación de la capacidad antioxidante. Existen diversos métodos para la evaluación de

este ensayo, las más comunes son las técnicas de el radical ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonatodiamonio)), el radical DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y el ensayo del poder reductor del ión férrico (FRAP) que se neutralizan, reduciéndose por SET. Este ensayo, evalúa la capacidad antioxidante de los péptidos de una manera sencilla, rápida y precisa (Arnao, 2000 y Sarmadi e Ismail, 2010).

En todos los casos, las técnicas espectrofotométricas que miden la capacidad antioxidante se basan en disolver el radical cromógeno en un medio apropiado; luego se agrega el antioxidante; a medida que se estabiliza el radical cromógeno la absorbancia va disminuyendo en un tiempo determinado y finalmente la disminución de la absorbancia es correlacionado en base a la curva de calibración de un antioxidante conocido (TROLOX, ácido gálico, L- ácido ascórbico, etc.). La capacidad antioxidante es expresada de acuerdo al antioxidante que se utilizó como estándar. La técnica del ABTS y DPPH estequiométricamente son similares por lo que ambas pueden utilizar como estándar el TROLOX (Arnao, 2000).

El ABTS es uno de los métodos más utilizados para evaluar la capacidad antioxidante debido a su gran estabilidad y solubilidad. El radical catión ABTS<sup>•+</sup> es un cromógeno (complejo azul verdoso) que se forma en presencia de enzimas (peróxidasa y mioglobina) o químicamente (persulfato de potasio ó dióxido de manganeso). La técnica del ABTS se basa en la habilidad de los antioxidantes de secuestrar el radical catión ABTS<sup>•+</sup>, disminuyendo la reacción del color (incoloro). De acuerdo a la ley de Lambert-Beer la intensidad de color es proporcional a la cantidad de radicales ABTS<sup>•+</sup>. Una de las ventajas de utilizar esta técnica es que puede ser utilizada en sistemas acuosos y lipofílicos. Este radical cromógeno es leído a diferentes absorbancias: 414 nm, 752 nm y 842 nm en soluciones acuosas; y a 730, 414 y 873 en solventes orgánicos. Por

lo que es utilizada en plasma y suero humano, en saliva, extractos de plantas, bebidas, etc. (Re *et al.*, 1999).

Por otro lado, la técnica del DPPH es un radical cromógeno estable que no necesita de ningún reactivo para que se forme el radical. Esta técnica espectrofotométrica sólo se lee a una absorbancia de 516 nm, se disuelve en presencia de solventes orgánicos (alcohol, metanol) por lo que actúa en presencia de antioxidantes hidrosolubles y es utilizada en extractos de plantas, bebidas, en productos lácteos (Larrauri *et al.*, 1998).

### III. HIPÓTESIS

La capacidad biogeneradora de péptidos antioxidantes producidos por *Lactococcus lactis* durante la fermentación de la leche está relacionada al ecosistema del cual fueron aislados.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de leches fermentadas por cepas de *Lactococcus lactis* aislados de diferentes ecosistemas.

### 4.2. Objetivos Particulares

1. Determinar la cinética de crecimiento de cepas de *Lactococcus lactis* de diferentes ecosistemas inoculados en leche.
2. Obtener extractos acuosos de leches fermentadas con cepas de *Lactococcus lactis* aisladas de diferentes ecosistemas.
3. Determinar el contenido de nitrógeno de extractos acuosos totales, extractos acuosos de  $\leq 10$  kDa y extractos acuosos de  $\leq 3$  kDa tanto en la fase exponencial como en la fase estacionaria de cepas de *Lactococcus lactis*.
4. Analizar por métodos colorimétricos la capacidad antioxidante de extractos acuosos de leches fermentadas por *Lactococcus lactis* aislados de diferentes ecosistemas.
5. Comparar de acuerdo al ecosistema de aislamiento de *Lactococcus lactis* sobre la capacidad biogeneradora de péptidos antioxidantes producidos durante la fermentación de leche.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Reactivación de las Cepas de *Lactococcus lactis*

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron 18 cepas de *Lactococcus lactis*, pertenecientes al cepario del Laboratorio de Química y Tecnología de Productos Lácteos, de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. de Hermosillo, Sonora (Tabla 4). Las 18 cepas fueron aisladas de tres ecosistemas: productos lácteos artesanales, vegetales y cultivos iniciadores comerciales (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2008). Las cepas fueron mantenidas en glicerol al 1:1 a -20°C. Todas las cepas fueron reactivadas inoculando 1% de suspensión bacteriana en caldo M17 (DIFCO, Spark, MD) suplementado al 10% en solución de lactosa (LM17), incubado a 30°C durante 24 h. Posteriormente, se realizaron dos sub-cultivos consecutivos adicionales.

### 5.2. Curvas de Crecimiento de Cepas de *Lactococcus lactis* en Leche Fermentada

La cinética de crecimiento de *L. lactis* se evaluó de acuerdo a la metodología propuesta por Muguerza *et al.* (2006), y Rodríguez-Figueroa *et al.* (2010). La leche descremada en polvo (Organic nonfat dry milk, non instant grade A, USDA Organic, USA) reconstituida al 10% (p/p) estéril (105°C/15 min) fue inoculada al 3% (v/v) con los cultivos de las diferentes cepas y posteriormente fueron incubadas a 30°C por 24 horas. Se prepararon un total de 18 tubos con leches fermentadas (3 tubos por cepa) que contenían cada uno 50 mL de leche.



**Tabla 4.** Código de identificación y origen del aislamiento de las cepas de *L. lactis* empleadas en este estudio.

CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN	ECOSISTEMA DE AISLAMIENTO	ORIGEN DE AISLAMIENTO
B7	Vegetal	Betabel
J6	Vegetal	Ejote
M1	Vegetal	Mazorca
M7	Vegetal	Hoja de maíz
R1	Lácteos Artesanales	Requesón
R7	Lácteos Artesanales	<i>L. lactis</i> NRRL-B-5071
Q1	Lácteos Artesanales	<i>L. lactis</i> NRRL-B-5072
Q2	Lácteos Artesanales	Queso menonita
Q3	Lácteos Artesanales	Queso chihuahua
Q5	Lácteos Artesanales	Queso chihuahua
C1	Cultivo comercial	Danisco®
Z1	Cultivo comercial	Danisco®
Z2	Cultivo comercial	Danisco®
E1	Cultivo comercial	Rhodia®
E3	Cultivo comercial	Rhodia®
P4	Cultivo comercial	Danisco®
K1	Cultivo comercial	Danisco®
K3	Cultivo comercial	Danisco®

Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2008

Las curvas de crecimiento se realizaron mediante la determinación de la población viable. La concentración celular de cada cepa se realizó mediante el método de siembra sobre superficie en placa. Los resultados fueron expresados como UFC/mL<sup>-1</sup> (Unidades Formadoras de Colonias/mL). La cuenta viable se realizó por triplicado y todas las colonias visibles fueron contadas utilizando un contador de colonias Quebec.

### 5.3. Capacidad Acidificante de las Cepas de *Lactococcus lactis*

De manera simultánea durante las curvas de crecimiento en leche, se midió el pH con la finalidad de determinar la capacidad acidificante de cada cepa. Las mediciones del pH se realizaron utilizando un potenciómetro modelo pH 211 (Hanna Instruments; Woonsocket, RI, EUA).

### 5.4. Obtención de Fracciones a partir del Suero de la Leche Fermentada

Se elaboraron leches fermentadas con las diferentes cepas ensayadas de *L. lactis*. Se tomaron alícuotas del cultivo inicial y se inocularon en 100 mL de leche estéril, luego de acuerdo a los tiempos en los que se alcanzó la fase exponencial y la fase estacionaria de cada una de las cepas inoculadas, se tomaron muestras de las leches fermentadas a las 2 h y 10 h para el caso de los *Lactococcus* aislados de lácteos artesanales; a las 4 h y 12 h para los vegetales y a las 6 h y 10 h para los cultivos iniciadores comerciales. Los procedimientos fueron realizados acordes con las metodologías propuestas por Mugerza *et al.* (2006) y Rodríguez-Figueroa *et al.* (2010).

Para frenar el proceso de fermentación, las leches fueron pasteurizadas a 75°C por un minuto. Cada una de las leches se centrifugó (Beckman J2-21, Fullerton, CA) de manera individual a 12, 100 rpm por 30 minutos, después se ultrafiltró utilizando membranas de celulosa (Millipore) de 10 kDa y 3 kDa, obteniendo tres fracciones: el extracto acuoso total, el extracto acuoso  $\leq 10$  kDa y el de  $\leq 3$  kDa. Los ultra filtrados se almacenaron a -20°C para su posterior análisis (Hogan *et al.*, 2009; Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2010).

#### 5.5. Contenido de Material Proteico de las Distintas Fracciones del Suero de la Leche Fermentada

El contenido de material proteico de las distintas fracciones (extracto acuoso,  $\leq 10$  kDa y  $\leq 3$  kDa) se midió utilizando el kit DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA, USA). El ensayo se realizó por el método de Lowry modificado, utilizando albumina sérica bovina (BSA) como estándar (Virtanen *et al.*; 2006). Esto se realizó con el fin de saber la cantidad de grupos amino libre que se tenía en cada fracción. También se determinó el contenido de nitrógeno total por el método de micro-Kjeldahl, basándose en la metodología de la AOAC (2002). El experimento se realizó por triplicado.

#### 5.6. Almacenamiento de las Fracciones

De cada una de las fracciones se tomó una alícuota de 15 mL y fueron depositadas en tubos de vidrio, luego se liofilizaron (Freeze Dry System, Kansas City, EUA, LABCONCO) a -45°C para su conservación. Los liofilizados fueron almacenados a -20°C en la oscuridad por duplicado (Virtanen *et al.*, 2006).

### 5.7. Preparación de las Fracciones (Extractos Acuosa)

Las fracciones liofilizadas se resuspendieron en solución amortiguadora PBS (0.05 mM, pH 7.4) preparada con agua milli-Q libre de iones, según lo descrito por Virtanen *et al.* (2006). Para todos los casos se guardó una concentración péptidica de 1.36 mg/mL en cada una de las fracciones a evaluar.

### 5.8. Evaluación de la Actividad Antioxidante *In vitro* en las Fracciones Derivadas de Leches Fermentadas con *Lactococcus lactis* Utilizando la Técnica ABTS

El método ABTS se siguió de acuerdo a lo descrito por Re *et al.* (1999) y Gómez-Ruíz *et al.* (2008). Primero, se formó el radical  $ABTS^{\bullet+}$ , usando ABTS sal diamonio (Sigma-Aldrich) diluida con una solución salina de buffer de fosfato (PBS) 0.05 mM a un pH de 7.4, se mezcló con persulfato de potasio (Sigma-Aldrich) 2.45 mM (1:0.5), quedando a una concentración final del radical  $ABTS^{\bullet+}$  de 7 mM. Se incubó de 14-16 h en la oscuridad a 30°C. Luego se tomaron 10  $\mu$ L de la muestra y se mezcló con 1 mL del reactivo  $ABTS^{\bullet+}$ . La mezcla que se formó anteriormente se monitoreó por 6 min a 30°C utilizando un espectrofotómetro (Nanodrop 2000 UV/VIS, Thermo Scientific). Se usó como blanco el PBS. Las mediciones se realizaron a una longitud de onda de 734 nm. Para poder llevar a cabo la evaluación de la capacidad antioxidante en equivalentes (mM) TROLOX (TEAC) por la técnica del  $ABTS^{\bullet+}$ , se realizó una curva de calibración, utilizando como patrón el TROLOX (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman -2- carboxílico), un compuesto análogo de la Vitamina E que actúa como antioxidante, que se cuantificó usando distintas concentraciones:

0.5 mM, 1.0 mM, 1.5 mM, 2,0 mM, 2.5 mM, 3.0 mM y 3.5 mM mismas que utilizaron Beltran *et al.* (2011).

La capacidad antioxidante de las fracciones peptídicas se pueden evaluar de dos formas, la primera es por TEAC (capacidad en equivalentes TROLOX) y la segunda por el porcentaje de la actividad antioxidante siguiendo la fórmula (Sadat *et al.*, 2011):

$$\% \text{ Actividad antioxidante: } \left[ \frac{(A_{734} \text{ ABTS} - A_{734} \text{ muestra})}{(A_{734} \text{ ABTS})} \right] \times 100$$

En la fórmula la  $A_{734}$  muestra: es la absorbancia de la muestra y  $A_{734}$  ABTS: es el ABTS solo, que debe de dar una lectura de  $0.700 \pm 0.020$  nm. Se utilizó como testigo leche sin inóculo. Cada uno de los extractos se midió por duplicado y el experimento se realizó por triplicado.

#### Evaluación de la Actividad Antioxidante *In vitro* de las Fracciones Derivadas de Leches Fermentadas con *Lactococcus lactis* Utilizando la Técnica DPPH.

El método fue desarrollado por Brand-Williams *et al.*, (1995), Larrauri *et al.* (1998) y Kushoski *et al.* (2005). El radical 2,2- difenil-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>) se diluyó en metanol al 80% (DPPH grado HPLC 99.99% de pureza, Sigma-Aldrich) obteniendo una concentración final de 65  $\mu$ M y se preparó en la oscuridad. Se añadió 25  $\mu$ L de muestra, se homogenizó agitando suavemente y se mantuvo en la oscuridad por 30 min a 26° C. Como blanco se utilizó metanol

al 80%. Después, se realizaron las lecturas a una longitud de onda de 516 nm, usando un espectrofotómetro (Nanodrop 2000 UV/VIS, Thermo Scientific). Se utilizó como estándar el TROLOX en distintas concentraciones para la curva de calibración que se disolvió con PBS 0.05 mM, pH 7.4. Se utilizó como testigo leche sin inóculo. Cada muestra se midió por duplicado y el experimento se realizó por triplicado.

La capacidad antioxidante se evaluó en unidades de equivalentes TROLOX (TEAC) y se calcularon los porcentajes de actividad antioxidante siguiendo la fórmula descrita por Saabena *et al.* (2010):

$$\% \text{ Actividad Antioxidante: } \left[ \frac{A_{516} \text{ DPPH} - A_{516} \text{ muestra}}{A_{516} \text{ DPPH}} \right] \times 100$$

En la fórmula la  $A_{516}$  muestra: es la absorbancia de la muestra y  $A_{516}$  ABTS: es el DPPH sólo, que debe de dar una lectura de 0.700 nm aproximadamente.

#### 5.10 Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico NCSS versión 2007. Se realizó un análisis modelo lineal general (GLM) por bloques completamente al azar, con el fin de evaluar los distintos parámetros. Los bloques analizados fueron: fase de crecimiento bacteriano; fracciones de diferente peso molecular, y ecosistemas de aislamiento de las cepas de *L. lactis*. La variable de respuesta fue la capacidad antioxidante la prueba se

realizó para un nivel de confianza del 95%, en caso de diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) se realizaron mediante una comparación de medias por Tuckey-Kramer.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Curvas de Crecimiento en Leche

Con el fin de determinar el comportamiento en relación al ecosistema de aislamiento de las cepas de *L. lactis*, se realizaron las curvas de crecimiento en leche de seis cepas representativas de cada uno de los ecosistemas (dos cepas por cada uno de ellos). Éste criterio de selección se hizo en base a los resultados obtenidos por Rodríguez (2008), que analizaron el comportamiento de estas mismas cepas utilizando un medio enriquecido de caldo M17 con lactosa al 10%, y en donde se observó que los *Lactococcus* seguían un patrón de crecimiento similar dentro de un mismo ecosistema. Las cepas seleccionadas de acuerdo al criterio anteriormente descrito fueron, para los aislados de cultivos iniciadores comerciales las cepas C1 y P4; para los vegetales las cepas B7 y M7, mientras que para los lácteos artesanales fueron las cepas R1 y Q3.

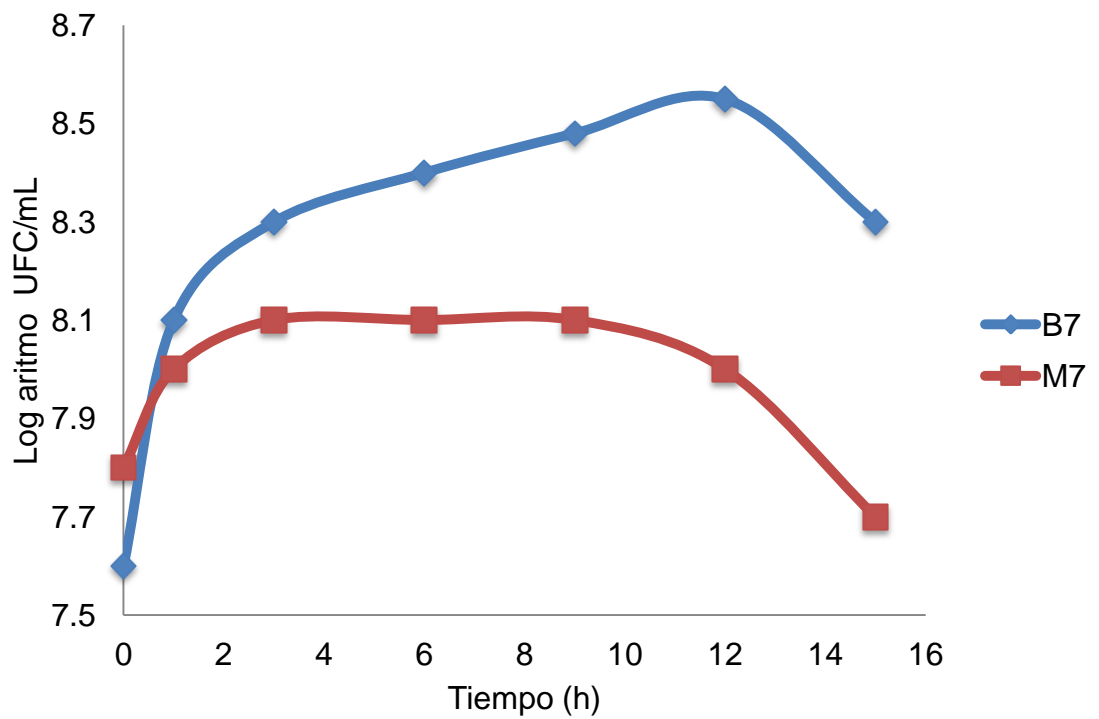
Los resultados obtenidos muestran que las cepas de *L. lactis* no presentaron fase de adaptación, esto último probablemente es debido a la concentración bacteriana inicial con la que se empezaron las curvas de crecimiento que fue de  $10^6$ - $10^7$  UFC/mL. Las cepas de *L. lactis* en medios nutritivos como la leche llegan a una concentración máxima de  $10^9$  UFC/mL, lo que concuerdan con los resultados obtenidos por Virtanen *et al.*, 2006. Por otra parte, Rodríguez (2008), quienes trabajaron con las mismas cepas de *L. lactis* en medio M17 enriquecido al 5% con una solución de lactosa (10%) obtuvieron una concentración máxima de  $10^{11}$  UFC/mL, esto comportamiento es debido, a que el caldo M17 es un medio enriquecido con peptonas, levaduras y carbohidratos como la lactosa, con la única finalidad de que las bacterias crezcan de manera



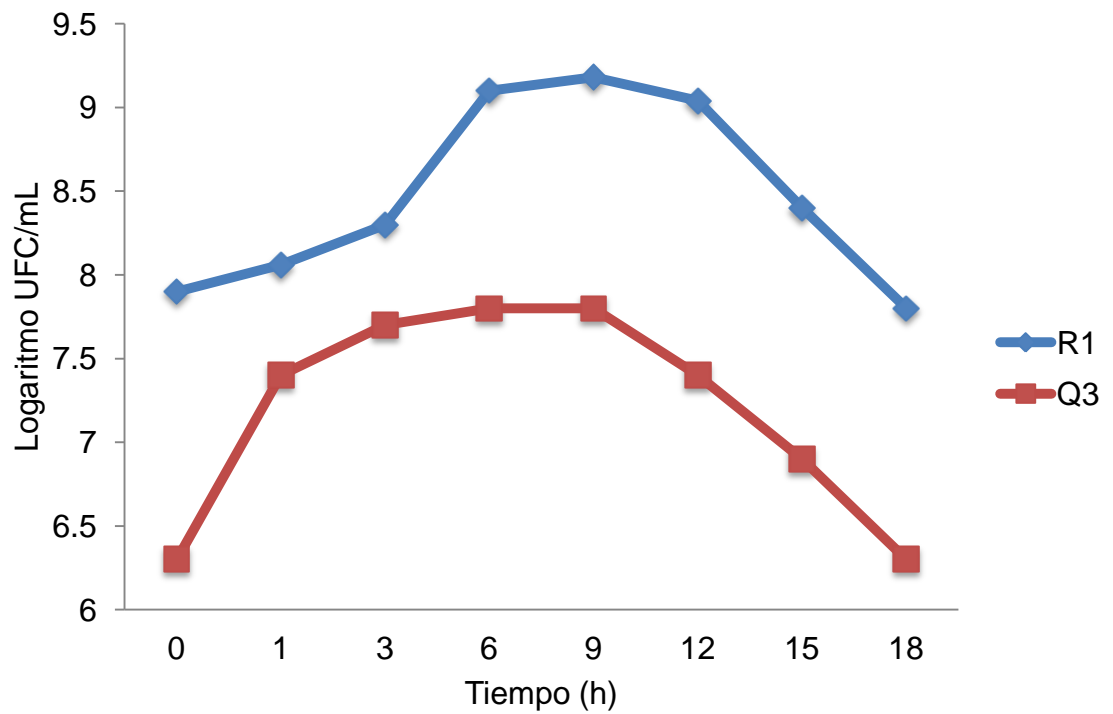
óptima, mientras que en leche, aunque es un medio rico en nutrientes, no tienen la misma disponibilidad.

Las cepas de *L. lactis* aisladas de productos lácteos artesanales, cultivos iniciadores comerciales y vegetales tuvieron un comportamiento similar ( $p > 0.05$ ) en su crecimiento bacteriano. En las Figuras 3, 4 y 5 se muestra el comportamiento de cada cepa de *L. lactis* observando que M7, B7, C1 y R1 son diferentes ( $p < 0.05$ ) a las cepas Q3 y P4. Las cepas aisladas de ecosistemas vegetales pudieron adaptarse al medio de leche descremada, pero el tiempo que llegaron a la fase estacionaria fue de 12 h, mientras que las cepas de los otros ecosistemas llegaron a su fase estacionaria a las 10 h. El comportamiento que se observó de las cepas de *L. lactis* aisladas de fuentes vegetales es debido a que tardan en adaptarse a medios diferentes, ya que se desarrollan bajo estrés (Teuber y Geis, 2006). Algunos reportes en la literatura enuncian que en un principio *L. lactis* sólo se localizaban en ecosistemas vegetales y fueron migrando a medios como los productos lácteos (Teuber y Geis, 2006; Rodríguez, 2008).

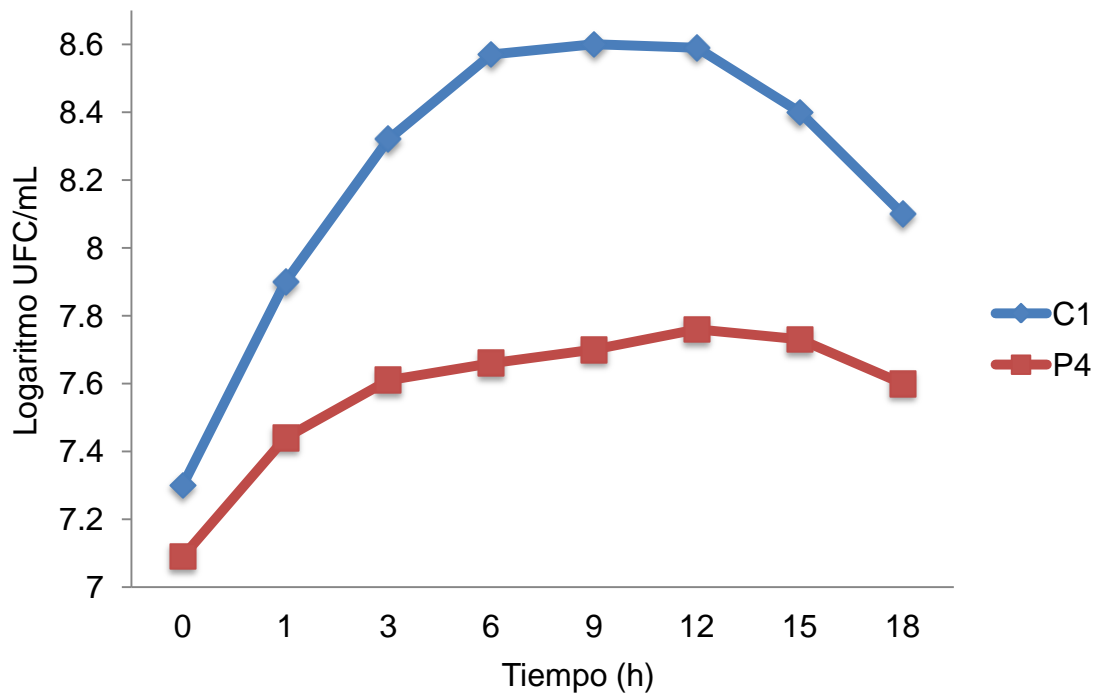
Una vez que se analizó el comportamiento de las cepas de *L. lactis* y de haber determinado tanto la fase exponencial de crecimiento bacteriano como la estacionaria uno de *L. lactis* representativos de cada ecosistema, se determinaron los tiempos de fermentación obteniendo la media de cada fase.



**Figura 3.** Curvas de crecimiento de dos cepas de *L. lactis* (30°C, 16 h) aisladas de vegetales. B7: betabel, M7: maíz..



**Figura 4.** Curvas de crecimiento de dos cepas de *L. lactis* (30°C, 16 h) aisladas de productos lácteos artesanales. R1: requesón, M7: queso Menonita.

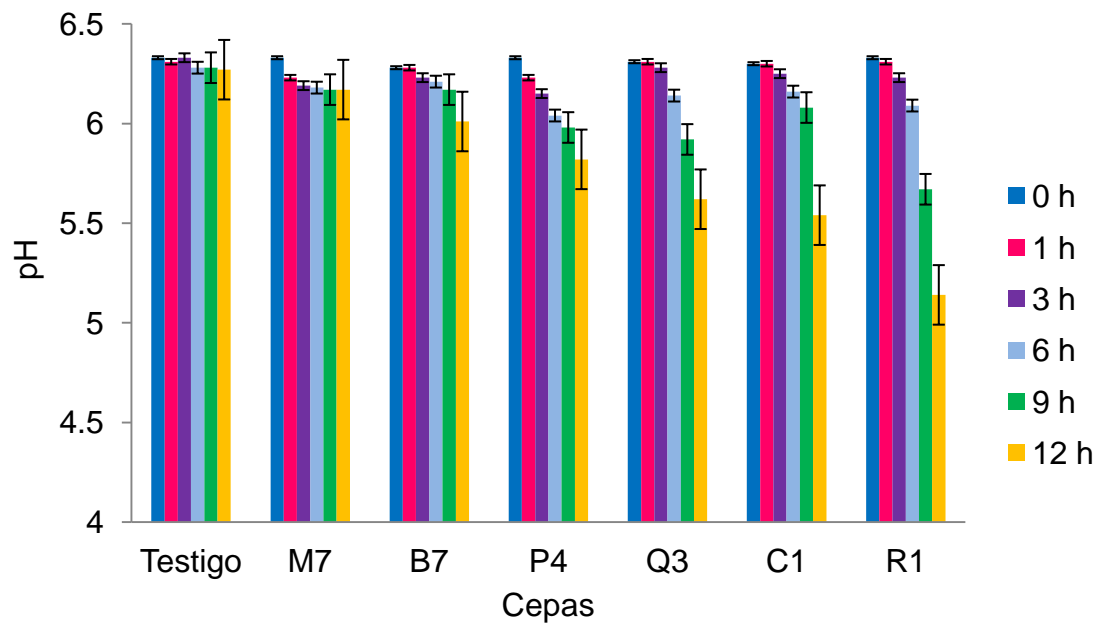


**Figura 5.** Curvas de crecimiento de dos cepas de *L. lactis* (30°C, 16 h) aisladas de cultivos iniciadores comerciales. C1: Danisco®, P4: Danisco®.

## 6.2. Capacidad Acidificante

Se evaluó la capacidad acidificante de las cepas de *L. lactis* para su posible uso como cultivos iniciadores. Una de las funciones de los cultivos iniciadores es la producción de ácido láctico en la manufactura del queso y de los productos lácteos fermentados (Ayad *et al.*, 2000; Teuber y Geis, 2006). El ácido láctico le brinda un sabor ácido-amargo a los productos lácteos (Leroy y De Vusty, 2006). Por lo anterior, se monitoreo las variaciones del pH durante la fermentación de la leche por las cepas de *L. lactis* aisladas de diversos ecosistemas en distintos tiempos 0, 1, 3, 6, 9 y 12 h.

Los resultados (Figura 6) mostraron que las cepas de *L. lactis* aisladas de productos lácteos artesanales, cultivos iniciadores comerciales y vegetales generaron ácido láctico a partir de la lactosa que se encontraba en la leche, demostrándose que las cepas aisladas de ecosistemas vegetales pudieron acondicionarse a medios como la leche. Un estudio llevado a cabo por Serna y Naranjo (2005), aislaron cepas de *L. lactis* a partir de la hoja de la caña de azúcar, observando la adaptación de la cepa a entornos con altas concentraciones de sacarosa, un carbohidrato que se encuentra en las plantas, ya que este microorganismo cuenta con el sistema enzimático para la hidrólisis del disacárido y metabolizan la glucosa por la vía glicolítica. De esta misma manera ocurre con el carbohidrato que se encuentra en la leche que es la lactosa, un disacárido compuesto de galactosa y glucosa.



**Figura 6.** Capacidad acidificante de cepas de *L. lactis* inoculadas en leche en diferentes períodos de tiempo (h).

Las cepas de *L. lactis* a las 1, 3 y 6 horas de fermentación no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en los valores de pH, sin embargo, para las 9 y 12 horas, hubo diferencias ( $p < 0.05$ ) en este parámetro (Figura 6). Las cepas aisladas de lácteos artesanales presentaron los valores de pH más bajos (5.14), siendo la cepa R1 la que presentó una mayor capacidad paramodificar el pH de medio.

### 6.3. Concentración Peptídica de las Distintas Fracciones del Suero de la Leches Fermentadas

Para llevar a cabo la evaluación de la capacidad antioxidante se determinó la concentración peptídica de las distintas fracciones de los extractos acuosos (extractos acuosos totales, extractos  $\leq 10$  kDa y extractos  $\leq 3$  kDa) provenientes de las diferentes leches fermentadas. Los resultados muestran (Tabla 5 y 6) que las fracciones peptídicas de los extractos acuosos  $\leq 10$  kDa y  $\leq 3$  kDa tuvieron valores de proteína total del 5% y de amino libre de 1%, tanto en la fase exponencial como en la fase estacionaria, de cada uno de los ecosistemas analizados, no encontrando diferencias significativas en éstas fracciones ( $p > 0.05$ ). En cuanto a las fracciones péptidicas de extractos acuosos totales, no se encontraron cambios significativos ( $p > 0.05$ ) en las leches fermentadas con cepas aisladas de productos lácteos artesanales y cultivos iniciadores comerciales; sin embargo, si hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), en las leches fermentadas aisladas de ecosistemas vegetales, en la fase exponencial (Tabla 6) en donde se obtuvo de proteína total un 36% y de amino libre un 40%; mientras que en la fase estacionaria de 26% y 33%.

Las bacterias para su sobrevivencia necesitan nitrógeno y lo obtienen a través de los aminoácidos que se encuentran en las proteínas, en este caso en

**Tabla 5.** Contenido de material proteico en la fase exponencial de la curva de crecimiento bacteriano

Ecosistemas de aislamiento	Fracciones peptídicas	Proteína total (%)	Nitrógeno total (%)
Testigo*	-	100 ± 0.01	100 ± 0.00
Vegetales	Extracto	36 ± 0.02 <sup>a</sup>	40 ± 0.01 <sup>a</sup>
	10 kDa	4 ± 0.01 <sup>b</sup>	1 ± 0.00 <sup>b</sup>
	3 kDa	4 ± 0.01 <sup>b</sup>	1 ± 0.00 <sup>b</sup>
Cultivos iniciadores comerciales	Extracto	27 ± 0.04 <sup>c</sup>	25 ± 0.01 <sup>c</sup>
	10 kDa	5 ± 0.01 <sup>b</sup>	2 ± 0.01 <sup>b</sup>
	3 kDa	5 ± 0.01 <sup>b</sup>	1 ± 0.01 <sup>b</sup>
Lácteos artesanales	Extracto	23 ± 0.03 <sup>c</sup>	25 ± 0.00 <sup>c</sup>
	10 kDa	5 ± 0.02 <sup>b</sup>	1 ± 0.01 <sup>b</sup>
	3 kDa	5 ± 0.01 <sup>b</sup>	1 ± 0.01 <sup>b</sup>

(\*): Leche sin inóculo del cual el 100% representa en el contenido de proteína total a 3.54 g/mL y en el caso del contenido de amino libre a 15.82 mg/mL.

Promedio ± DE.

Diferente letra en la misma columna indica diferencias significativas (p<0.05).

DE= Desviación estándar.



**Tabla 6.** Contenido de material proteico en la fase estacionaria de la curva de crecimiento bacteriano

Ecosistemas de aislamiento	Fracciones péptidicas	Proteína total (%)	Nitrógeno total (%)
Testigo*	-	100 ± 0.01	100 ± 0.00
Vegetales	Extracto	26 ± 0.02 <sup>a</sup>	33 ± 0.01 <sup>a</sup>
	10 kDa	5 ± 0.01 <sup>b</sup>	1 ± 0.01 <sup>b</sup>
	3 kDa	5 ± 0.01 <sup>b</sup>	1 ± 0.01 <sup>b</sup>
Cultivos iniciadores comerciales	Extracto	25 ± 0.02 <sup>c</sup>	23 ± 0.01 <sup>c</sup>
	10 kDa	5 ± 0.02 <sup>b</sup>	2 ± 0.01 <sup>b</sup>
	3 kDa	4 ± 0.01 <sup>b</sup>	1 ± 0.01 <sup>b</sup>
Lácteos artesanales	Extracto	19 ± 0.02 <sup>d</sup>	23 ± 0.01 <sup>c</sup>
	10 kDa	5 ± 0.02 <sup>b</sup>	2 ± 0.01 <sup>b</sup>
	3 kDa	4 ± 0.01 <sup>b</sup>	1 ± 0.01 <sup>b</sup>

(\*): Leche sin inóculo del cual el 100% representa en el contenido de proteína total a 3.54 g/mL y en el caso del contenido de amino libre a 15.82 mg/mL.

Promedio ± DE.

Diferente letra en la misma columna indica diferencias significativas (p<0.05).

DE= Desviación estándar.

la leche. Las cepas de *L. lactis* por medio de su sistema proteolítico activan sus enzimas que desdoblan las proteínas (Teuber y Geis, 2006).

Según lo observando en este estudio, en la fase exponencial las bacterias demandan una mayor cantidad de nitrógeno, por otro lado en la fase estacionaria se agotan los nutrientes, hay cambios en el pH y se forman sustancias tóxicas que causan la muerte de la bacteria, por lo que hay menos contenido de nitrógeno liberado.

#### 6.4. Preparación Liofilizados a partir de los Extractos Peptídicos de la Leche Fermentada

A partir de los liofilizados y de acuerdo a los resultados obtenidos de contenido de nitrógeno total y el contenido de amino libre se estableció la cantidad de liofilizado de la fracción peptídica necesaria para la evaluación de la capacidad antioxidante. El criterio se basó en la concentración peptídica mínima de 1.36 mg/mL que se obtuvo de las 18 cepas de *L. lactis* estudiadas en este trabajo.

6.5. Evaluación de la Capacidad Antioxidante *in vitro* en las Fracciones Peptídicas Derivadas de las Leches Fermentadas Utilizando la Técnica ABTS

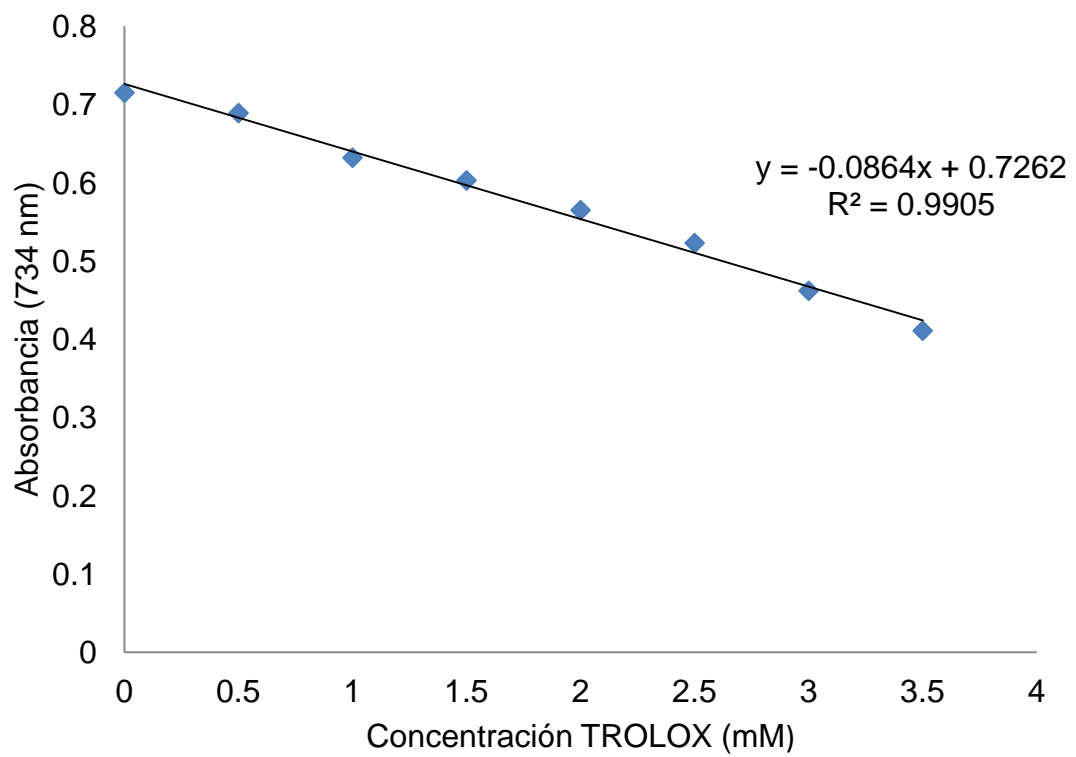
**6.5.1. Capacidad Antioxidante Expresada como Equivalentes de TROLOX (TEAC) Utilizando la Técnica ABTS**

De acuerdo a los datos obtenidos en la cuantificación de TROLOX se observó que a mayor concentración de TROLOX (antioxidante) se presentó menor absorbancia, y viceversa (Figura 7), ya que el espectrofotómetro lo que detecta a una longitud de onda de 734 nm es el radical catión  $ABTS^{\bullet+}$ . Por lo anterior, si se agrega una mayor concentración de antioxidante, el radical catión  $ABTS^{\bullet+}$  disminuye y hay menor absorbancia.

El comportamiento para las diferentes concentraciones de estándar de TROLOX fue lineal y en donde la ecuación obtenida de la recta fue  $y = -0.0864X + 0.7262$  obteniendo una  $R^2$  de 0.9905. En la ecuación “y” es la absorbancia de la muestra (antioxidante) y “x” representa TEAC. La ecuación despejada queda de la siguiente manera:

$$x = \frac{(-0.726 + y)}{(-0.0864)}$$

La  $R^2$  que se obtuvo fue de 0.9905 muy cercana a 1, por lo cual se consideró que la ecuación es válida para el cálculo de TEAC en las muestras



**Figura 7.** Curva de calibración del TROLOX para la técnica del ABTS.

comparada con estudios previos de capacidad antioxidante de leches fermentadas con bacterias ácido lácticas (Gupta *et al.*, 2009).

Las cepas de *L. lactis* aisladas de distintos ecosistemas fueron capaces de generar péptidos con capacidad antioxidante en leches fermentadas, los valores de TEAC de las muestras provenientes de cepas aisladas de cultivos iniciadores comerciales se encontraron en un rango de 407-1015  $\mu\text{M}$  de TROLOX; mientras las provenientes de productos lácteos artesanales presentaron 477-1620  $\mu\text{M}$  de TROLOX y por último las cepas vegetales presentaron 378- 1368  $\mu\text{M}$  de TROLOX, los resultados mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los distintos ecosistemas. Virtanen *et al.* (2006), realizaron un estudio con cepas de *L. lactis* aisladas de cultivos comerciales europeos encontrando que los péptidos generados tenían una capacidad antioxidante de 160  $\mu\text{M}$  de TROLOX, valor menor que la que se encontró en este trabajo. Esto demuestra que la capacidad antioxidante está en función de los péptidos (metabolitos) generados por las bacterias aisladas de diversos ecosistemas debido a que cuentan con un único y propio sistema proteolítico.

Los valores individuales de TEAC de cada cepa evaluada pueden observarse en la Tablas 7, 8 y 9, los resultados obtenidos muestran que la capacidad antioxidante varió de acuerdo al peso molecular de las fracciones. Las leches fermentadas con mayor capacidad antioxidante fueron R1>Q5>R7>Q1 procedentes de productos lácteos artesanales, seguido de las cepas B7>J6>M1 aisladas de vegetales y por último Z1>E3>C1 de cultivos iniciadores comerciales. Todas las cepas de *L. lactis* independientemente de su ecosistema de aislamiento presentaron ( $p < 0.05$ ) mayor capacidad antioxidante en

**Tabla 7.** Capacidad antioxidante en leches fermentadas por 2 h (fase exponencial) y 10 h (fase estacionaria) con cepas de *L. lactis* aisladas de lácteos artesanales determinada con la técnica ABTS.

Cepas	Fracciones Peptídicas	Fase de crecimiento bacteriano	
		Fase Exponencial <sup>b</sup> TEAC (μM)	Fase Estacionaria <sup>a</sup> TEAC (μM)
R7 <sup>c</sup>	Extracto	477 ± 0.02	1015 ± 0.01
	10 kDa	691 ± 0.00	1038 ± 0.01
	3 kDa	1073 ± 0.00	1530 ± 0.04
R1 <sup>a</sup>	Extracto	529 ± 0.00	960 ± 0.01
	10 kDa	656 ± 0.00	1194 ± 0.02
	3 kDa	812 ± 0.01	1620 ± 0.02
Q1 <sup>c</sup>	Extracto	486 ± 0.01	922 ± 0.01
	10 kDa	564 ± 0.01	957 ± 0.01
	3 kDa	801 ± 0.00	1536 ± 0.02
Q2 <sup>d</sup>	Extracto	870 ± 0.02	789 ± 0.00
	10 kDa	844 ± 0.00	963 ± 0.01
	3 kDa	1009 ± 0.01	1307 ± 0.05
Q3 <sup>e</sup>	Extracto	705 ± 0.01	882 ± 0.01
	10 kDa	674 ± 0.02	758 ± 0.00
	3 kDa	720 ± 0.00	992 ± 0.01
Q5 <sup>b</sup>	Extracto	616 ± 0.00	1061 ± 0.01
	10 kDa	619 ± 0.02	1365 ± 0.01
	3 kDa	648 ± 0.01	1605 ± 0.02

TEAC: Capacidad Antioxidante en Equivalentes TROLOX (Promedio ± DE).  
Diferente letra en la misma columna indica diferencias significativas (p<0.05).

**Tabla 8.** Capacidad antioxidante en leches fermentadas por 4 h (fase exponencial) y 12 h (fase estacionaria) con cepas de *L. lactis* aisladas de vegetales determinada con la técnica ABTS.

Ecosistemas Vegetales	Fracciones Péptidicas	Fases de crecimiento bacteriano	
		Fase Exponencial <sup>b</sup> TEAC (μM)	Fase Estacionaria <sup>a</sup> TEAC (μM)
B7 <sup>a</sup>	Extracto	607 ± 0.01	558 ± 0.001
	10 kDa	584 ± 0.01	442 ± 0.00
	3 kDa	772 ± 0.01	1368 ± 0.04
J6 <sup>ab</sup>	Extracto	604 ± 0.00	1151 ± 0.00
	10 kDa	708 ± 0.00	1021 ± 0.00
	3 kDa	1302 ± 0.03	1264 ± 0.02
M1 <sup>c</sup>	Extracto	378 ± 0.00	381 ± 0.00
	10 kDa	433 ± 0.01	448 ± 0.00
	3 kDa	633 ± 0.02	1108 ± 0.02
M7 <sup>d</sup>	Extracto	668 ± 0.00	407 ± 0.01
	10 kDa	662 ± 0.02	488 ± 0.01
	3 kDa	535 ± 0.00	876 ± 0.00

TEAC: Capacidad Antioxidante en Equivalentes TROLOX (Promedio ± DE  
Diferente letra en la misma columna indica diferencias significativas (p<0.05).

**Tabla 9.** Capacidad antioxidante en leches fermentadas por 6 h (fase exponencial) y 10 h (fase estacionaria) con cepas de *L. lactis* aisladas de cultivos iniciadores comerciales determinada con la técnica ABTS.

Cepas	Fracciones Peptídicas	Fases de Crecimiento bacteriano	
		Fase Exponencial TEAC ( $\mu\text{M}$ )	Fase Estacionaria TEAC ( $\mu\text{M}$ )
K1 <sup>ac</sup>	Extracto	494 $\pm$ 0.00	488 $\pm$ 0.00
	10 kDa	500 $\pm$ 0.01	419 $\pm$ 0.00
	3 kDa	486 $\pm$ 0.00	407 $\pm$ 0.00
K3 <sup>ab</sup>	Extracto	604 $\pm$ 0.01	471 $\pm$ 0.01
	10 kDa	604 $\pm$ 0.01	477 $\pm$ 0.00
	3 kDa	639 $\pm$ 0.00	512 $\pm$ 0.01
E1 <sup>abc</sup>	Extracto	419 $\pm$ 0.00	517 $\pm$ 0.01
	10 kDa	416 $\pm$ 0.02	572 $\pm$ 0.01
	3 kDa	593 $\pm$ 0.01	572 $\pm$ 0.01
E3 <sup>ab</sup>	Extracto	488 $\pm$ 0.01	705 $\pm$ 0.02
	10 kDa	514 $\pm$ 0.01	700 $\pm$ 0.01
	3 kDa	523 $\pm$ 0.00	969 $\pm$ 0.01
P4 <sup>abc</sup>	Extracto	500 $\pm$ 0.00	705 $\pm$ 0.00
	10 kDa	543 $\pm$ 0.01	694 $\pm$ 0.00
	3 kDa	624 $\pm$ 0.02	899 $\pm$ 0.02
C1 <sup>abc</sup>	Extracto	604 $\pm$ 0.00	639 $\pm$ 0.02
	10 kDa	679 $\pm$ 0.00	731 $\pm$ 0.01
	3 kDa	772 $\pm$ 0.02	867 $\pm$ 0.01
Z1 <sup>abc</sup>	Extracto	627 $\pm$ 0.00	679 $\pm$ 0.03
	10 kDa	697 $\pm$ 0.01	818 $\pm$ 0.02
	3 kDa	731 $\pm$ 0.01	1015 $\pm$ 0.02
Z2 <sup>abc</sup>	Extracto	723 $\pm$ 0.00	703 $\pm$ 0.02
	10 kDa	798 $\pm$ 0.01	807 $\pm$ 0.01
	3 kDa	815 $\pm$ 0.01	847 $\pm$ 0.01

TEAC: Capacidad Antioxidante en Equivalentes TROLOX (Promedio  $\pm$  DE).  
Diferente letra en la misma columna indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



extractos acuosos (EA)  $\leq$  3 kDa a diferencia de los extractos acuosos totales y extractos  $\leq$  10 kDa.

Sadat *et al.* (2011), mencionan que la capacidad antioxidante de los péptidos depende de tres características principales: tamaño del péptido, presencia de aminoácidos aromáticos y carácter hidrofóbico, hay una mayor capacidad antioxidante, sobre todo si se localizan en los extremos de la cadena del péptido, y los péptidos de carácter hidrofóbico presentan mayor capacidad que los hidrofílicos.

En cuanto a las fases de crecimiento bacteriano de las cepas de *L. lactis*, la estacionaria presentó en promedio una capacidad antioxidante de 1088  $\mu$ M de TROLOX en comparación a la exponencial de 741  $\mu$ M de TROLOX ( $p < 0.05$ ). Las bacterias en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase de exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de enzimas proteolíticas que desdoblan las proteínas presentes en la leche para obtener péptidos (Freeman, 1986).

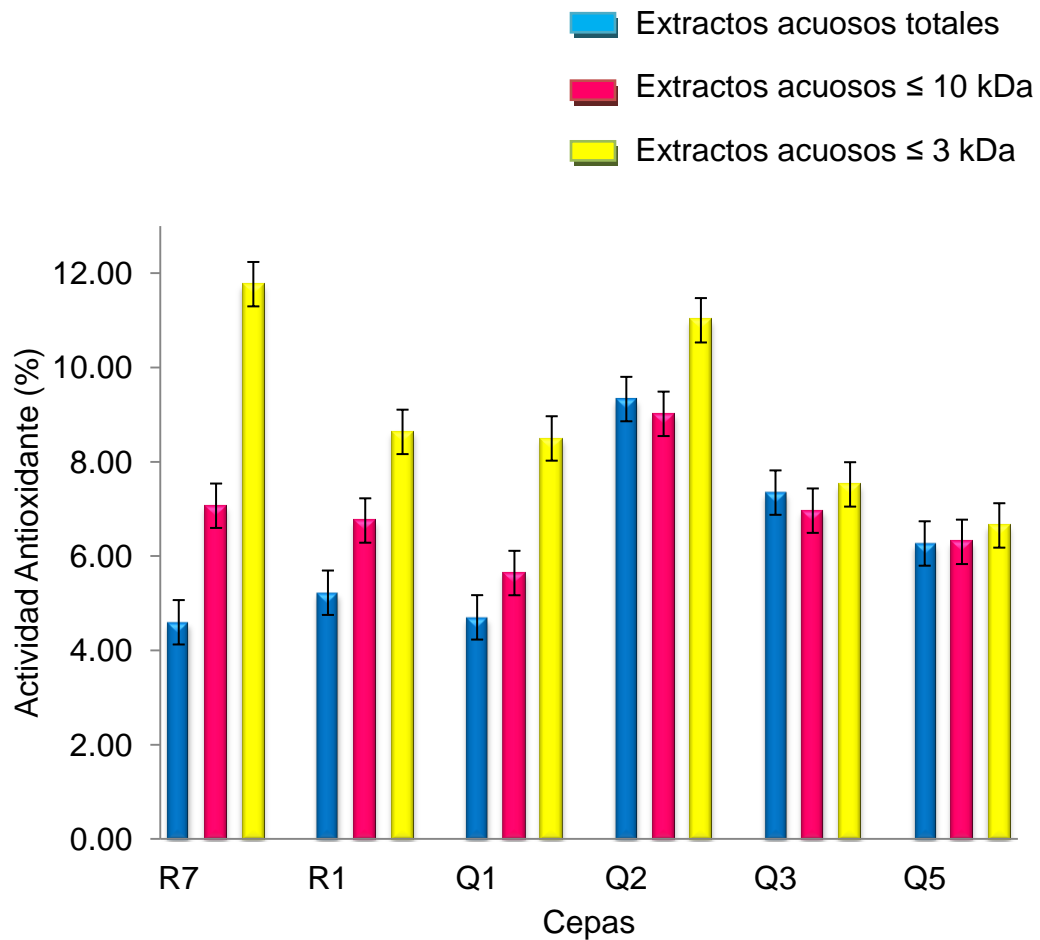
### **6.5.2. Actividad Antioxidante Utilizando técnica ABTS**

La capacidad antioxidante de los péptidos derivadas de las cepas de *L. lactis* estuvo en función del ecosistema de aislamiento. La tendencia mostró que los péptidos provenientes cepas aisladas de productos lácteos artesanales tuvieron mayor ( $p < 0.05$ ) capacidad antioxidante, seguido de los vegetales y por último los cultivos iniciadores comerciales. Las cepas que generaron mayor cantidad de péptidos antioxidantes según su ecosistema fueron R1>Q5>R7>Q1 de productos lácteos artesanales; B7>J6>M1 de vegetales y por último Z1>E3>P4 de cultivos iniciadores comerciales.

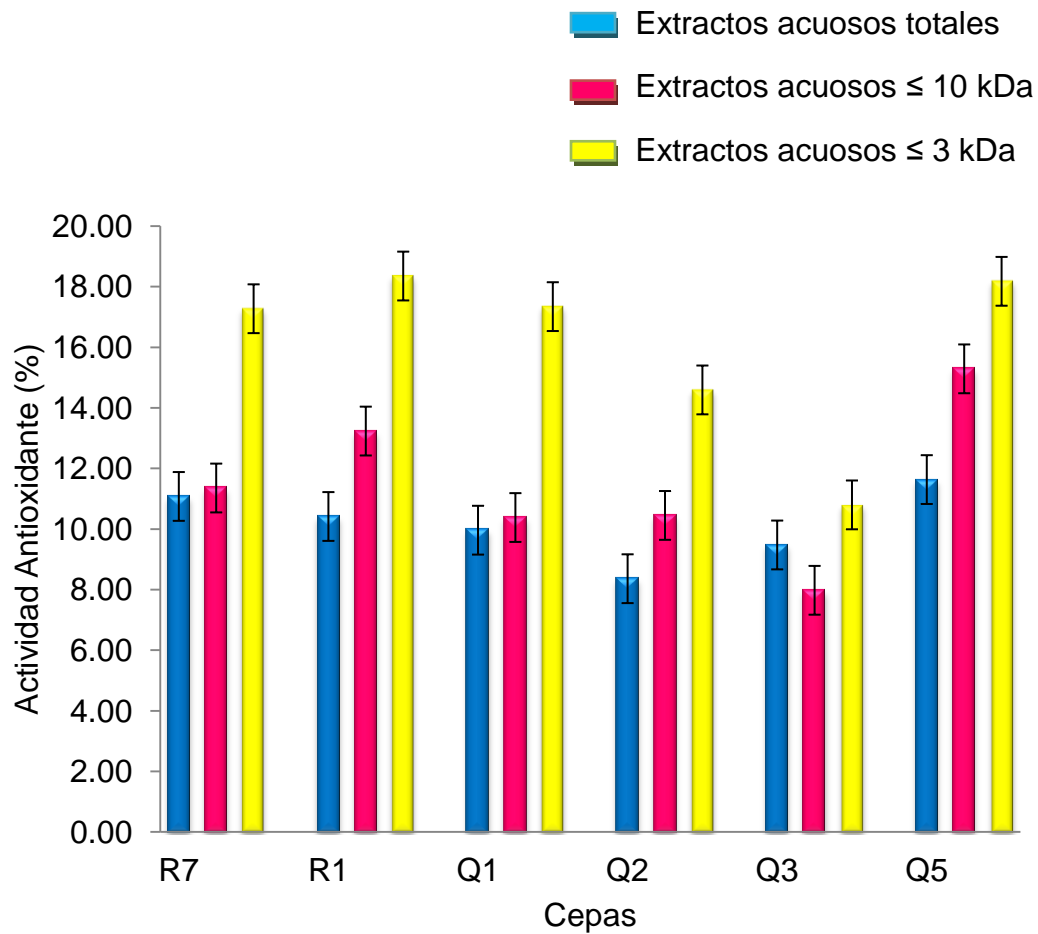
Los resultados obtenidos del contenido peptídico muestran que las cepas aisladas de vegetales tienen mayor concentración de péptidos y por lo tanto debería de ser proporcional al porcentaje de actividad antioxidante; sin embargo, los resultados muestran que no depende de la cantidad de péptidos generados por la bacterias de *L. lactis*, sino que está asociado a la cepa usada durante la fermentación láctea. Estudios realizados con estas BAL aisladas de diferentes ecosistemas han observado que algunas propiedades, como la capacidad autolítica, la capacidad proteolítica, la capacidad antioxidante (Virtanen *et al.*, 2006; Beltrán, 2011), la capacidad antihipertensiva (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2010) y la producción de compuestos que les dan sabor y aroma (Leroy y De Vuyst, 2006; Reyes, 2010) a algunos productos lácteos dependen del tipo de cepa y del ecosistema de aislamiento.

Las fracciones de los extractos acuosos que tuvieron mayor porcentaje de actividad antioxidante fueron los  $\leq 3$  kDa. No se encontró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los extractos acuosos totales y los extractos acuosos  $\leq 10$  kDa demostrándose con esto, que la actividad antioxidante está asociada a péptidos de bajo peso molecular. Las cepas que presentaron mayor capacidad antioxidante en los extractos acuosos  $\leq 3$  kDa fueron J6 (14.5%), R7 (11.8%), Q2 (11%), y Z2 (8.7%) en la fase exponencial y las cepas R1 (18.35%), Q5 (18.18%), Q1 (17.34%), R7 (17.27%) y B7 (15.32%) en la fase estacionaria. Hernández-Ledesma *et al.* (2005), reportaron que la capacidad antioxidante de los péptidos está relacionada a su tamaño, es decir que entre más pequeño sea el péptido, ejerce una mayor actividad antioxidante.

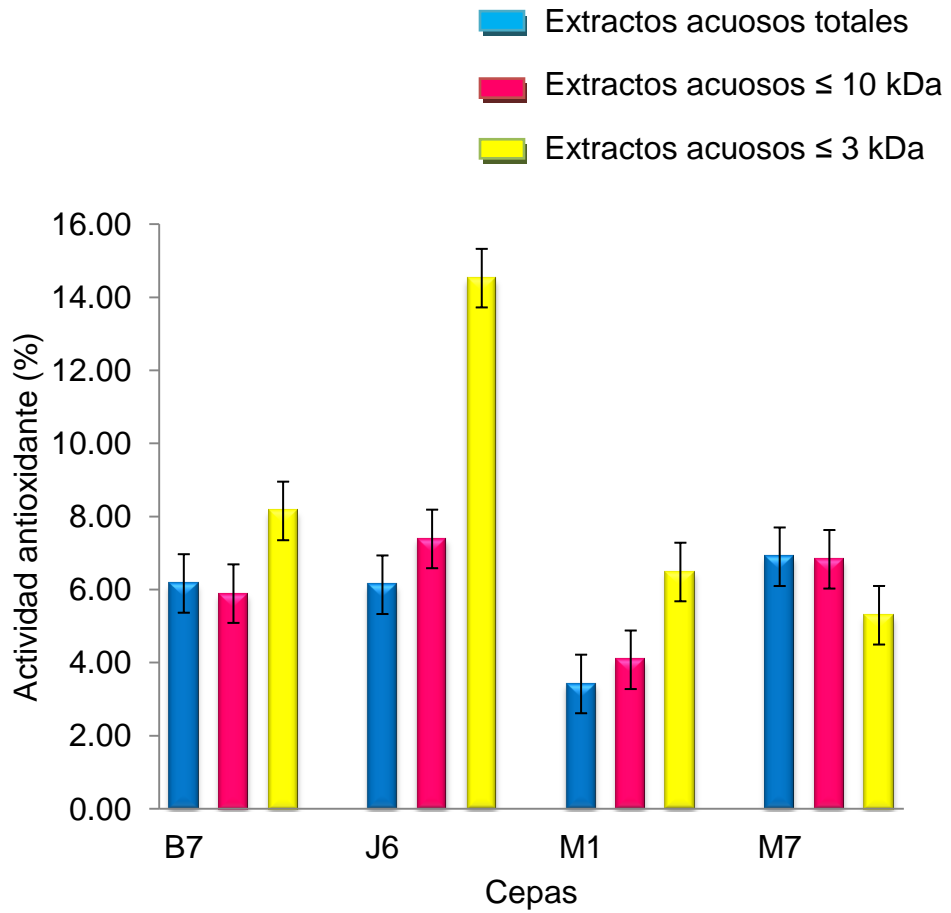
En cuanto a las fases de crecimiento bacteriano, la fase estacionaria (Figuras 9,11 y 13) presentó en promedio 12% de actividad antioxidante; mientras que en la fase exponencial (Figuras 8,10 y 12) fue de tan solo 8% ( $p < 0.05$ ). Beltrán (2011), trabajaron con las mismas cepas de *L. lactis*, pero sólo manejaron EA  $\leq 3$  kDa fermentando las leches en un lapso de 48 h, un periodo



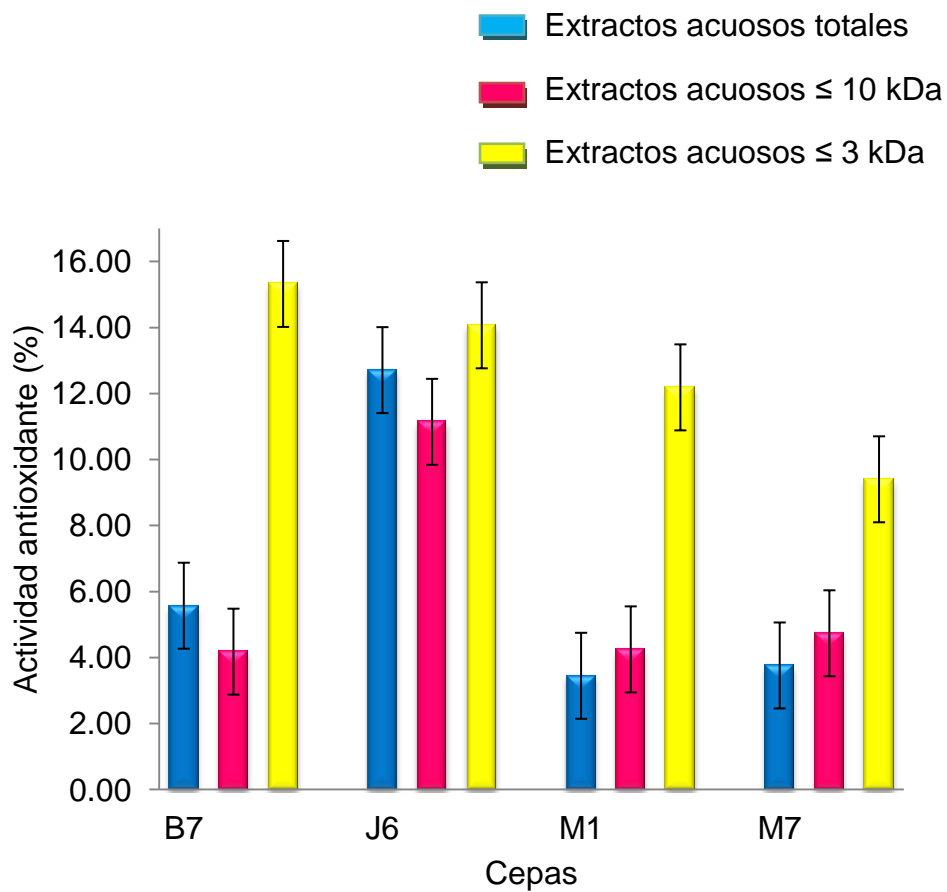
**Figura 8.** Actividad antioxidante de los extractos acuosos provenientes de leches fermentadas con *L. lactis* aisladas de lácteos artesanales en la fase de crecimiento exponencial utilizando la técnica ABTS.



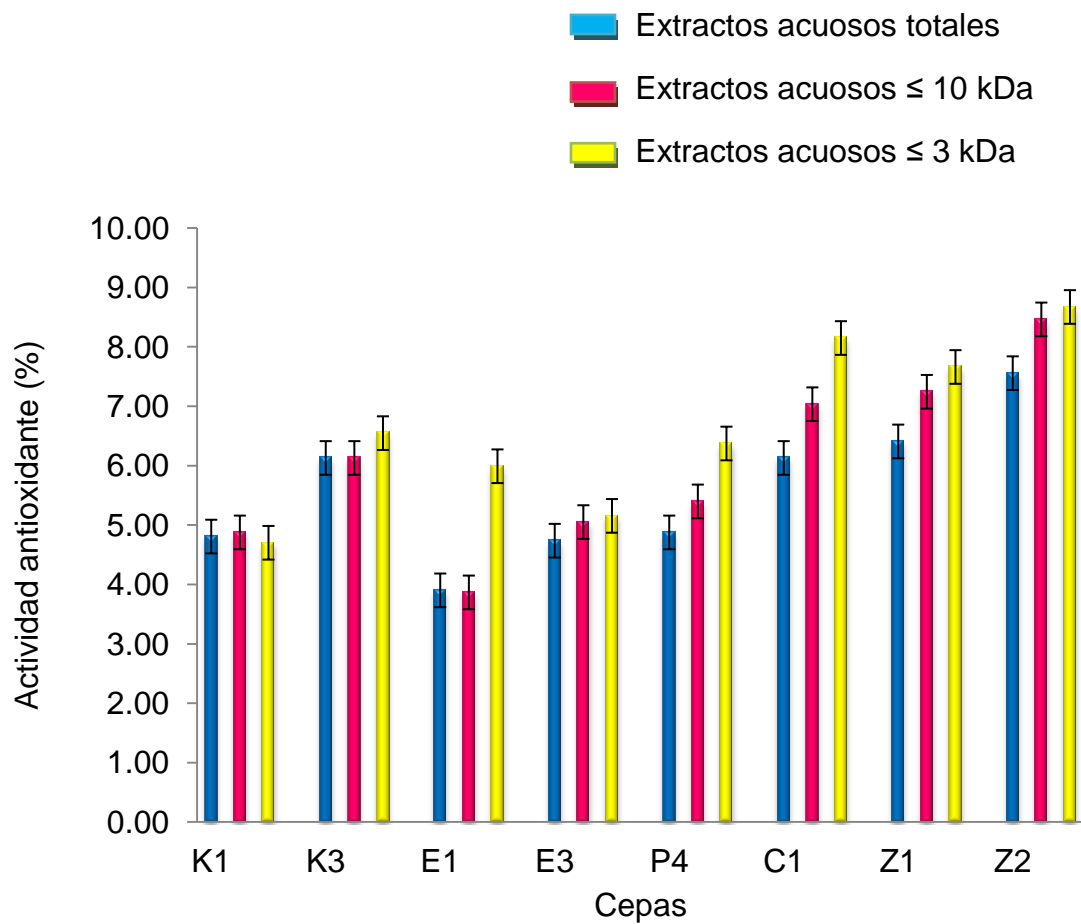
**Figura 9.** Actividad antioxidante de los extractos acuosos provenientes de leches fermentadas con *L. lactis* aisladas de lácteos artesanales en la fase de crecimiento estacionaria utilizando la técnica ABTS.



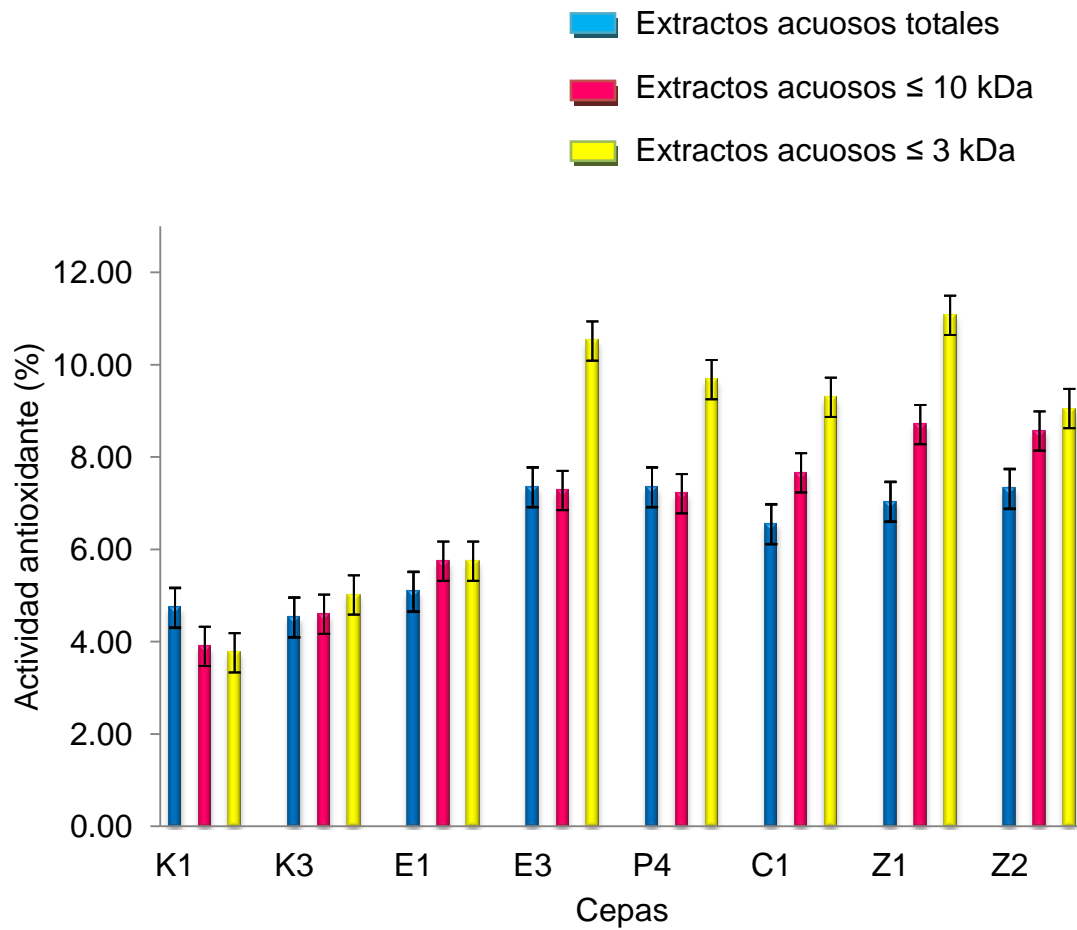
**Figura 10.** Actividad antioxidante de los extractos acuosos provenientes de leches fermentadas con *L. lactis* aisladas de vegetales en la fase de crecimiento exponencial utilizando la técnica ABTS.



**Figura 11.** Actividad antioxidante de los extractos acuosos provenientes de leches fermentadas con *L. lactis* aisladas de vegetales en la fase de crecimiento estacionaria utilizando la técnica ABTS.



**Figura 12.** Actividad antioxidante de los extractos acuosos provenientes de leches fermentadas con cepas de *L. lactis* aisladas de cultivos iniciadores comerciales en fase de crecimiento exponencial utilizando la técnica ABTS.



**Figura 13.** Actividad antioxidante de los extractos acuosos provenientes de leches fermentadas con *L. lactis* aisladas de cultivos iniciadores comerciales en la fase de crecimiento estacionaria utilizando la técnica ABTS.



de tiempo en donde las bacterias de *L. lactis* se encuentran en su fase de senescencia, encontrando una actividad antioxidante del 53%, mayor que la encontrada en este trabajo. Esto podría deberse a que las proteinasas y peptidasas de las cepas de *L. lactis* interactuaron con las caseínas y las proteínas del suero de la leche en un tiempo prolongado, generando más péptidos bioactivos. Sin embargo era importante conocer si la actividad antioxidante persistía con menores tiempos de fermentación, ya que los cultivos comerciales comúnmente emplean tiempos menores a 18 horas.

De acuerdo a los datos obtenidos para la actividad antioxidante y por TEAC las cepas de *L. lactis* que generaron péptidos con mayor capacidad antioxidante fueron las provenientes de productos lácteos artesanales y de vegetales en sus extractos acuosos  $\leq 3$  kDa en la fase estacionaria de su curva de crecimiento.

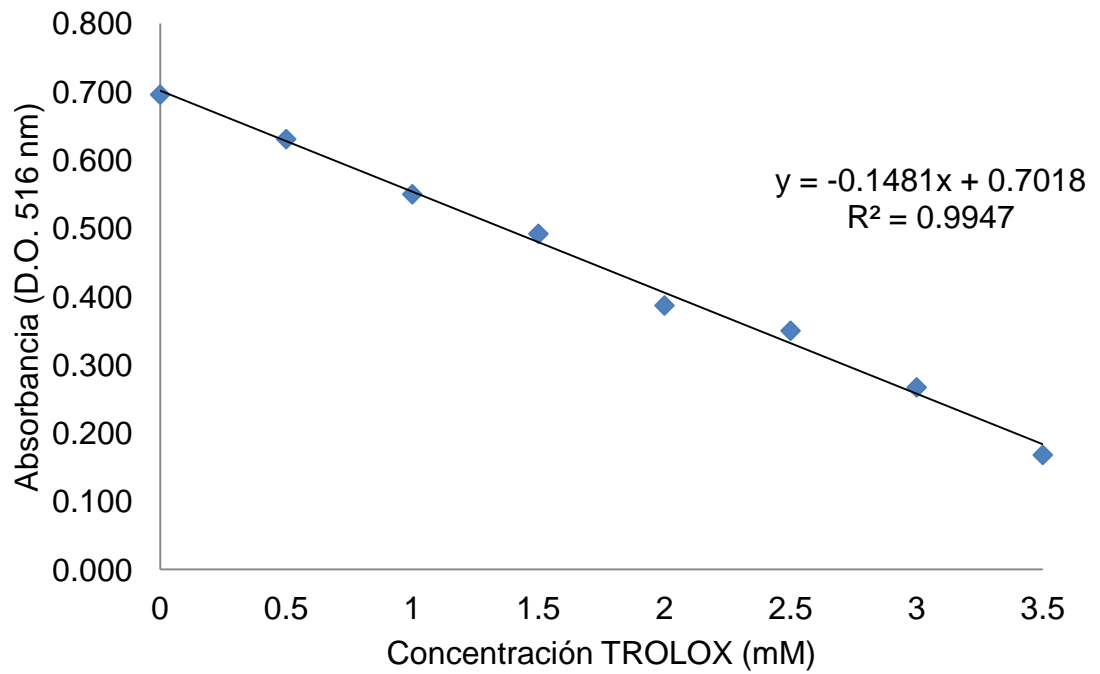
Estudios de las enzimas proteolíticas de las cepas de *L. lactis* podrían permitir una mayor comprensión acerca de las diferencias que existen en cuanto al origen de aislamiento y los sitios de afinidad que tienen las enzimas proteolíticas hacia las proteínas de la leche.

6.6. Evaluación de la Actividad Antioxidante *in vitro* de las Fracciones Peptídicas Derivadas de las Leches Fermentadas Utilizando la Técnica DPPH.

**6.6.1. Capacidad Antioxidante Expresada en Equivalentes de TROLOX (TEAC) Utilizando la Técnica DPPH.**

Para poder llevar a cabo las mediciones de los extractos acuosos (EA) se cuantificó el TROLOX, un antioxidante utilizado como estándar, obteniendo como ecuación de la pendiente  $y = -0.1481x + 0.7018$  con una  $R^2$  de 0.9947. La curva de calibración (Figura 14) se realizó con la finalidad de saber si la forma en la que se estaba efectuando la técnica era la adecuada para así obtener datos precisos y reproducibles.

Cabe recordar que el presente trabajo evaluó la capacidad antioxidante de los péptidos derivados de la leche fermentada bajo tres parámetros: las distintas fracciones de los péptidos asociados al peso molecular; el tiempo de fermentación de la cepa de acuerdo a su fase de crecimiento bacteriano y el ecosistema de aislamiento de la cepa de *L. lactis*.



**Figura 14.** Curva de calibración del TROLOX para la técnica DPPH.

Los resultados obtenidos en relación al ecosistema de aislamiento de las cepas *L. lactis*, no mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), sin embargo la tendencia indica que las cepas de *L. lactis* aisladas de vegetales fueron las que tuvieron mayor capacidad antioxidante, seguida por los cultivos iniciadores comerciales y por último los lácteos artesanales.

De acuerdo a los resultados obtenidos de las distintas fracciones de los EA asociados a su peso molecular no se hallaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), sin embargo la tendencia indicó que los extractos acuosos con mayor capacidad antioxidante fueron las fracciones  $\leq 3$  kDa de las cepas J6 (363  $\mu\text{M}$  de TROLOX), E1 (313  $\mu\text{M}$  de TROLOX), P4 (299  $\mu\text{M}$  de TROLOX) y Z1 (265  $\mu\text{M}$  de TROLOX).

Qian *et al.* (2011), trabajaron con EA de leches fermentadas con cepas de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. bulgaricus LB340 y observaron que las fracciones peptídicas con un peso molecular de 3-1 kDa tenían mayor actividad antioxidante que las fracciones de 10-5 kDa. Peng *et al.* (2009), reportaron que a partir de las proteínas de suero de leche hidrolizadas por la enzima alcalasa, obtuvieron cuatro fracciones peptídicas de diferentes pesos moleculares:  $>40$ , 40-2.8, 2.8-0.1 y  $<0.1$  kDa, la capacidad de secuestrar radicales libres de estos péptidos estuvo en relación a su peso molecular, mostrando las fracciones de 2.8-0.1 kDa una mayor capacidad para secuestrar los radicales libres.

En cuanto a la fases de crecimiento bacteriano solo algunos extractos acuosos presentaron péptidos con capacidad antioxidante ( $p > 0.05$ ). En el caso de los EA aislados de cultivos iniciadores comerciales los que presentaron péptidos con capacidad antioxidante fueron E1, E3, P4, C1 y Z2 en la fase de crecimiento exponencial y K1, E1, E3, P4, C1, Z1 y Z2 en la fase estacionaria como se muestra en la Tablas 10.

**Tabla 10.** Capacidad antioxidante en leches fermentadas por 6 h (fase exponencial) y 10 h (fase estacionaria) con cepas de *L. lactis* aisladas de cultivos iniciadores comerciales determinada con la técnica DPPH.

Cepas	Fracciones Peptídicas	Fases de Crecimiento bacteriano	
		Fase Exponencial <sup>a</sup> TEAC (μM)	Fase Estacionaria <sup>b</sup> TEAC (μM)
K1	3 kDa	-	108 ± 0.02
E1	Extracto	98 ± 0.02	122 ± 0.01
	10 kDa	102 ± 0.01	211 ± 0.01
E3	3 kDa	211 ± 0.01	313 ± 0.01
	Extracto	51 ± 0.01	139 ± 0.00
	10 kDa	-	147 ± 0.00
P4	3 kDa	-	174 ± 0.00
	Extracto	63 ± 0.01	-
	10 kDa	189 ± 0.01	169±0.00
C1	3 kDa	299 ± 0.02	269 ± 0.00
	Extracto		86 ± 0.00
	10 kDa		-
Z1	3 kDa	98 ± 0.01	56 ± 0.00
	Extracto	-	
	10 kDa	-	223 ± 0.02
Z2	3 kDa	-	265 ± 0.01
	Extracto	-	142 ± 0.00
	10 kDa	-	156 ± 0.00
	3 kDa	102 ± 0.01	154 ± 0.01

TEAC: Capacidad Antioxidante en Equivalentes TROLOX (Promedio ± DE).  
Diferente letra en la misma columna indica diferencias significativas (p<0.05).

De las cuatro cepas de *L. lactis* aisladas de ecosistemas vegetales solo dos presentaron péptidos antioxidantes (Tabla 11): J6 y M1 en las fase de crecimiento bacteriano exponencial y estacionaria. De los 108 extractos acuosos que se analizaron en este estudio, el que presento mayor capacidad antioxidante fue J6 de 367  $\mu\text{M}$  de TROLOX en la fase estacionaria.

Los EA aislados de lácteos artesanales R1, R7, Q1, Q2, Q3 y Q5 generaron péptidos con capacidad antioxidante en la fase exponencial siendo los valores más altos de TEAC: R1 (302  $\mu\text{M}$  de TROLOX), Q1 (286  $\mu\text{M}$  de TROLOX) y R7 (259  $\mu\text{M}$  de TROLOX). Por otra parte, en la fase estacionaria de las seis cepas sólo cuatro presentaron capacidad antioxidante: R1, Q1, Q3 y Q5 presentando los valores más altos de TEAC los extractos acuosos Q5 (149  $\mu\text{M}$  de TROLOX); R1 (127  $\mu\text{M}$  de TROLOX) y Q1 (122  $\mu\text{M}$  de TROLOX). Las cepas de *L. lactis* de origen lácteo artesanal en la fase de crecimiento exponencial mostraron el doble del valor de capacidad antioxidante en equivalentes TROLOX en comparación a la fase estacionaria (Tabla 12). Lo anterior podría deberse a que la técnica del DPPH sólo es capaz de medir ciertos compuestos hidrosolubles. Es probable que se encuentren más péptidos en la fase exponencial que en la fase estacionaria. Esto no significa que en la fase estacionaria no haya péptidos con capacidad antioxidante.

**Tabla 11.** Capacidad antioxidante en leches fermentadas por 4 h (fase exponencial) y 12 h (fase estacionaria) con cepas de *L. lactis* aisladas de vegetales determinada con la técnica DPPH.

Cepas	Fracciones Peptídicas	Fases de crecimiento bacteriano	
		Fase Exponencial <sup>a</sup> TEAC (μM)	Fase Estacionaria <sup>b</sup> TEAC (μM)
J6	Extracto	32 ± 0.00	-
	10 kDa	176 ± 0.00	367 ± 0.01
	3 kDa	189 ± 0.01	363 ± 0.02
M1	10 kDa	125 ± 0.01	68 ± 0.01
	3 kDa	132 ± 0.01	233 ± 0.03

Promedio ± DE

Diferente letra en la misma columna indica diferencias significativas (p<0.05)

**Tabla 12.** Capacidad antioxidante en leches fermentadas por 2 h (fase exponencial) y 10 h (fase estacionaria) con cepas de *L. lactis* aisladas de productos lácteos artesanales determinada con la técnica DPPH.

Cepas	Fracciones Peptídicas	Fases de Crecimiento bacteriano	
		Fase Exponencial <sup>a</sup> TEAC (μM)	Fase Estacionaria <sup>b</sup> TEAC (μM)
R7	Extracto	86 ± 0.01	-
	10 kDa	127 ± 0.01	-
	3 kDa	259 ± 0.00	-
R1	Extracto	53 ± 0.02	29 ± 0.00
	10 kDa	245 ± 0.02	127 ± 0.01
	3 kDa	302 ± 0.00	117 ± 0.02
Q1	Extracto	286 ± 0.01	122 ± 0.00
	10 kDa	259 ± 0.00	-
	3 kDa	157 ± 0.01	-
Q2	Extracto	-	-
	10 kDa	88 ± 0.01	-
	3 kDa	164 ± 0.01	-
Q3	Extracto	103 ± 0.00	-
	10 kDa	-	-
	3 kDa	-	100 ± 0.01
Q5	Extracto	83 ± 0.00	-
	10 kDa	88 ± 0.01	149 ± 0.02
	3 kDa	186 ± 0.00	34 ± 0.01

Promedio±DE

Diferente letra en la misma columna indica diferencias significativas (p<0.05)



### 6.6.2. Actividad antioxidante Utilizando la Técnica DPPH

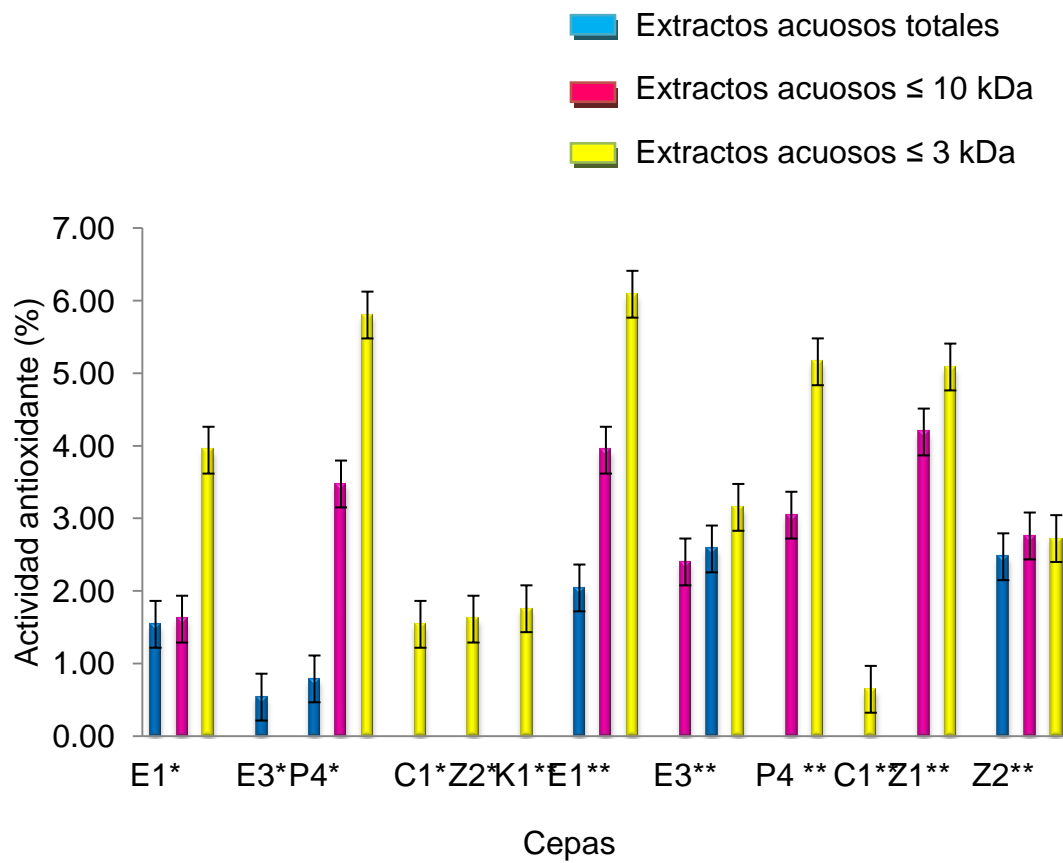
Los resultados utilizando la técnica DPPH mostraron que las cepas aisladas de cultivos iniciadores comerciales (Figura 15) produjeron péptidos antioxidantes con actividad de hasta 6.03%; en el caso de las cepas aisladas de productos lácteos artesanales (Figura 16) fue de 5.87% y para las de origen vegetal (Figura 17) de 7.23%. En cuanto al origen de aislamiento no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), sin embargo la tendencia indica que las cepas de *L. lactis* de origen vegetal generaron péptidos con mayor capacidad antioxidante.

Jain *et al.* (2009), observaron que *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactococcus lactis*, al ser utilizadas como cultivos iniciadores en la fermentación láctea generaban metabolitos como los péptidos que actuaban como antioxidantes capaces de estabilizar las especies reactivas al oxígeno y radicales libres.

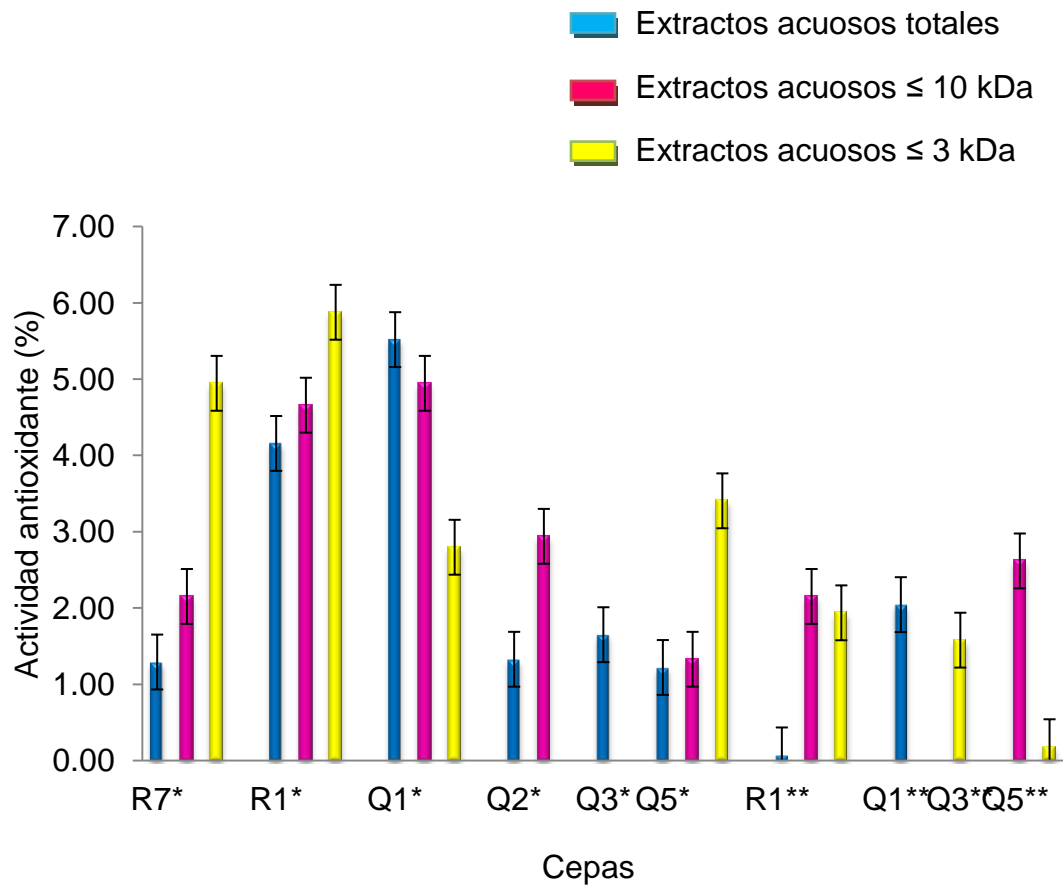
De acuerdo al peso molecular de las fracciones peptídicas, los EA que presentaron mayor actividad antioxidante fueron J6 (ejote), E1 (Danisco) y R1 (requesón); no encontrando cambios significativos ( $p > 0.05$ ); sin embargo, los resultados indican que las fracciones  $\leq 3$  kDa desarrollaron mayor capacidad antioxidante que los extractos acuosos totales y los  $\leq 10$  kDa.

Pihlanto-Lëppala (2006), revela que la capacidad antioxidante de las distintas fracciones peptídicas generadas por la hidrólisis de la caseína depende de la composición y naturaleza del péptido en sí.

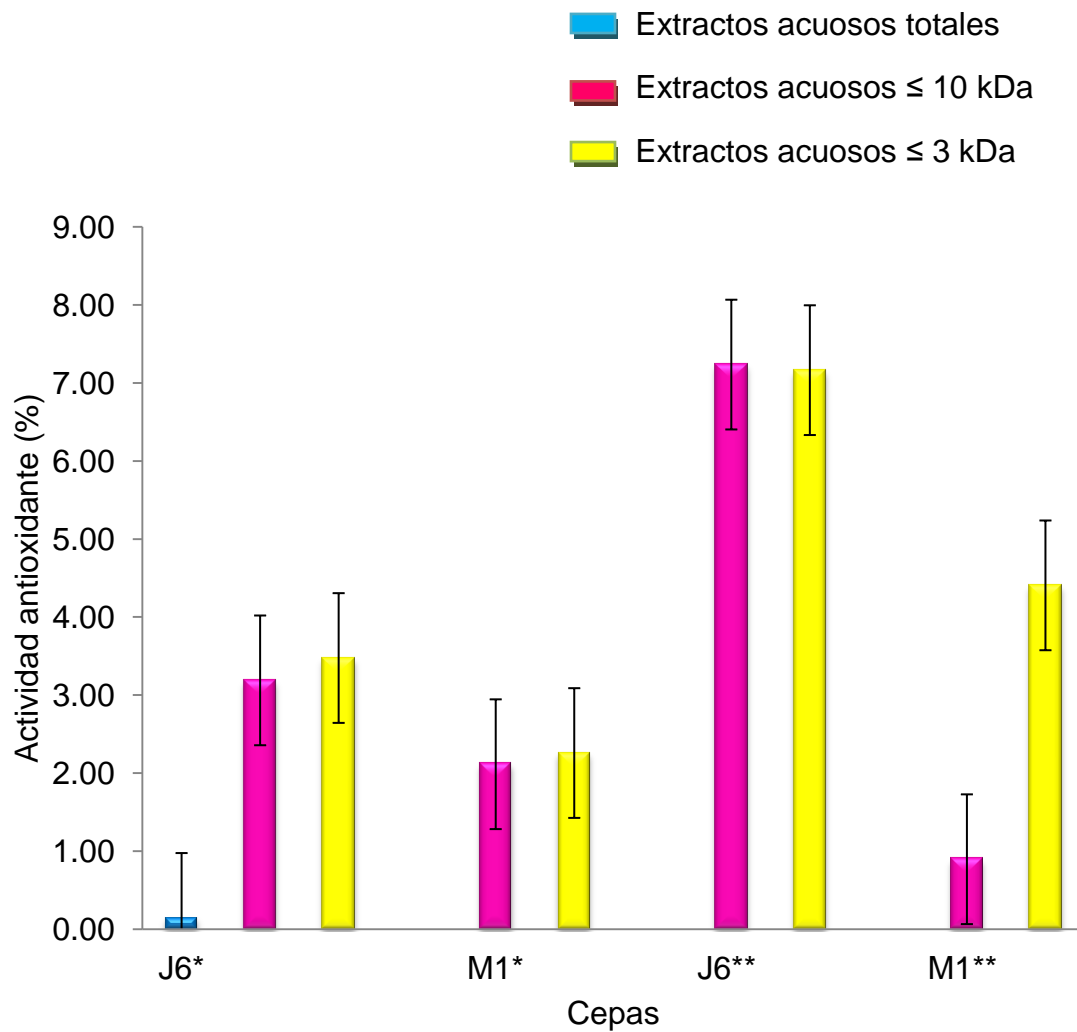
De acuerdo a las fases de crecimiento bacteriano ( $p > 0.05$ ), la fase exponencial presentó una actividad antioxidante de un rango de 0.14- 5.87%, mientras que en la estacionaria se muestran rangos de 0.18- 7.23%.



**Figura 15.** Actividad antioxidante de los extractos acuosos provenientes de leches fermentadas con *L. lactis* aisladas de cultivos iniciadores comerciales utilizando la técnica DPPH. (\*): Determinación en fase exponencial. (\*\*): Determinación en fase estacionaria.



**Figura 16.** Actividad antioxidante de los extractos acuosos provenientes de leches fermentadas con *L. lactis* aisladas de productos lácteos artesanales utilizando la técnica DPPH. (\*): Determinación en fase exponencial. (\*\*): Determinación en fase estacionaria.



**Figura 17.** Actividad antioxidante de los extractos acuosos provenientes de leches fermentadas con *L. lactis* aisladas de vegetales utilizando la técnica DPPH. (\*): Determinación en fase exponencial.  
(\*\*): Determinación en fase estacionaria.

Virtanen *et al.* (2006), monitorearon la actividad antioxidante con respecto al tiempo de fermentación de la leche usando como cultivos iniciadores a las bacterias ácido lácticas (44 h), observando que conforme transcurría el tiempo de la fermentación se presentaba una mayor actividad antioxidante. También mencionan que de acuerdo a la especificidad de la enzima proteolítica de la bacteria fermentadora hacia las proteínas de la leche, la capacidad antioxidante del péptido dependerá de la hidrólisis de la proteína.

Como resumen de resultados, utilizando la técnica ABTS se obtuvo una capacidad antioxidante para la fase exponencial 1009  $\mu\text{M}$  de TROLOX (8% actividad antioxidante) y en la fase estacionaria de 1620  $\mu\text{M}$  de TROLOX (12% actividad antioxidante). Los extractos acuosos de las fracciones péptidicas menores o iguales a 3 kDa son los que presentan una mayor capacidad antioxidante en comparación a los EA totales y los EA  $\leq 10$  kDa. De acuerdo al ecosistema de aislamiento los que presentaron mayor capacidad antioxidante son las cepas aisladas de productos lácteos artesanales, posteriormente las de origen vegetal y por último los cultivos iniciadores comerciales.

Por otra parte, en la técnica espectrofotométrica DPPH se observó una capacidad antioxidante en la fase exponencial de las curvas de crecimiento de hasta 302  $\mu\text{M}$  de TROLOX (5.87% actividad antioxidante) y en la fase estacionaria de 367  $\mu\text{M}$  de TROLOX (7.23% actividad antioxidante). Sin embargo, no se encontró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) para la capacidad antioxidante entre el tamaño y la fase de crecimiento de la curva. Aunque la tendencia mostró que los péptidos con mayor capacidad antioxidante fueron las aisladas de vegetales, seguido por los cultivos iniciadores comerciales y por último los productos lácteos artesanales.

De acuerdo a los resultados obtenidos por las dos técnicas espectrofotométricas, la capacidad antioxidante de equivalentes de TROLOX por la técnica del ABTS es cuatro veces mayor, que la técnica del DPPH. Por

otro lado, los resultados de la actividad antioxidante de los péptidos por la técnica del ABTS es dos veces mayor que por la técnica del DPPH. La técnica de DPPH mide solo compuestos hidrosolubles que a diferencia de la técnica ABTS detecta un rango más amplio. Además, el radical catión ABTS<sup>•+</sup> es más estable que el radical DPPH<sup>•</sup> utilizando como muestras extractos acuosos derivados de la leche fermentada.

Finalmente, en el presente trabajo se observó que las cepas de *L. lactis* aisladas de productos lácteos artesanales (R1, Q5, R7, Q1 y Q2) y vegetales (B7, J6 y M1) a través de sus enzimas proteolíticas degradan las proteínas de la leche generando péptidos con mayor capacidad antioxidante que las aisladas de cultivos iniciadores comerciales. Estos resultados coinciden con los trabajos realizados por Rodríguez-Figueroa *et al* (2010), que evaluaron péptidos con capacidad antihipertensiva y Beltrán (2011), que trabajó con péptidos con capacidad antioxidante  $\leq 3$  kDa derivadas de leches fermentadas con cepas de *L. lactis*. En dichos estudios se menciona que las cepas de *L. lactis* aisladas de productos lácteos artesanales, en especial las cepas R7, Q1 y M1, son los que generan la mayor cantidad de péptidos bioactivos.

Estudios futuros deberán encausarse a determinar la secuencia de aminoácidos de los péptidos presentes para determinar con exactitud las características que tienen para donar un electrón ó un átomo de hidrógeno. Asimismo, a la realización de estudios en modelos murinos para demostrar la actividad antioxidante *in vivo*.

## VII. CONCLUSIONES

Las cepas de *Lactococcus lactis* aisladas de lácteos artesanales y vegetales son viables para ser considerados como cultivos iniciadores con potencial actividad antioxidante.

Las cepas de *L. lactis* aisladas de distintos ecosistemas generaron péptidos con capacidad antioxidante *in vitro* en leches fermentadas. La capacidad antioxidante de los péptidos derivadas de *L. lactis* estuvo en función al origen de aislamiento. La tendencia mostró que los péptidos provenientes de lácteos artesanales tuvieron mayor capacidad antioxidante, seguido de los vegetales y por último cultivos iniciadores comerciales.

Lo anterior es de gran interés ya que los péptidos antioxidantes derivados de cepas de *L. lactis* aisladas de lácteos artesanales y vegetales pueden ser candidatas para utilizarse en estudios *in vivo* en modelos murinos para su posterior aplicación en humanos.

Los péptidos antioxidantes derivados de la leche fermentada son compuestos tanto hidrosolubles como liposolubles. Siendo los péptidos antioxidantes de peso molecular  $\leq 3$  kDa los de mayor porcentaje de actividad, en las fases de crecimiento bacteriano estacionaria.

## VIII. REFERENCIAS

- Aleixandre, A., Dávalos, A., Bartolomé, B., Ferreras, M. M., Recio, I., López-Fandiño, R. y Ramos, M. 2005. Obtención con péptidos con actividad hipertensiva y antioxidante a partir de proteínas de clara de huevo. *Alimentaria: Rev. de tec. e higiene de los alimentos*. 362: 44-51.
- Arao, M.B. 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Sci and Technology*. 11: 419-421.
- AOAC. 2002. *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists. Keneth Helrich (Ed) I y II.
- AOAC. 2005. *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists. Keneth Helrich (Ed) I y II.
- Arcan, I. y Yemeniciog, A. 2007. Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans. *Food Chemistry*. 103. 301–312.
- Ayad, E., Verheul, A., Wouters, J.T.M. y Smit, G. 2000. Application of wild starter cultures for flavour development in pilot plant cheese making. *J. Dairy Sci*. 10:169-179.
- Badui, S. 2006. *Química de los Alimentos*. 4ta. Edición. Editorial Pearson.
- Baró, L., Jiménez, J., Martínez-Férez, A. y Bouza, J.J. 2001. Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *Ars. Pharmaceutica*. 42(3-4):135-145.
- Beltrán, L. 2011. Evaluación in vitro de la actividad antioxidante en leches fermentadas por *Lactococcus lactis*. CIAD. México.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. y Berset, C. 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm. Wiss. Technol*. 28: 25-30.
- Blokhina, O., Virolainen, E. y Fagerstedt, K.V. 2003. Antioxidative, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*. 91: 179-194.



- Blot, W.J., Li, J.Y., Taylor, P.R., Guo, W., Dawsey, S., Wang, G.Q., Zheng, S.F., Gail, M., Li, G.Y., Yu, Y., Liu, B, Tangrea, J., Sun, Y., Liu, F., Fraumeni, J.F., Zhang, Y.H., Li, B. 1993. Nutritional Intervention Trial in Linxian, China: Supplementation with Specific Vitamin/Mineral Combination, Cancer Incidence, and Disease-Specific Mortality in the General Population. *J Natl Cancer Inst.*18:1483-1491.
- Challem, J. y Block, M. 2008. Antioxidantes naturales. Edición Nowtillus, S.L. Madrid. 1,2, 3: 15- 23.
- Coskun, S., Belma, A. y Yuksekdog, Z. N. 2009. Effect of two strains of *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus* on nitric oxide generation and antioxidant status of rat small intestine. *Med Chem Res.*
- Dekker, M. 2004. New York: Salminen, S., Von Wright, A. y Ouwenhand. 453–505.
- Díaz-Ambrona, C.G. 2004. La transformación industrial de la producción agropecuaria. España. Ministerio de educación y ciencia.
- Fedorak, R.N., Madsen, K.L. 2004. Probiotics and prebiotics in gastrointestinal disorders. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 20:146–55
- Freeman, B, A. Microbiología de Burrows. 1986. Edición 22. Editorial Interamericana, España. 57-62.
- Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A. y Di Cagno, R. 2002. Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Critical Reviews in Food Sci and Nutr.*
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A. y Di Cagno, R. 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci Technol.* 16:57–69. doi:10.1016/j.tifs.2004.02.013.
- Gómez-Ruiz, J.A., López-Exposito, E., Pihlanto, A., Ramos, E.M. y Recio, I. 2008. Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC–MS/MS. *Eur Food Res Technol.* 227: 1061–1067.
- González-Torres, M.C., Betancourt-Rule, M., Ortiz-Muñiz, R., 2000. Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Redalyc. Bioquímica.* 25 (1): 3-9.

- Guadix, A.; Guadix, E. M.; Paez-Dueñas, M. P.; Gonzalez-Tello, P. y Camacho, F. 2000. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1): 79-89
- Gupta, A. B., Mann, R., Kumar., Sangwan, R.B. 2009. Antioxidant activity of cheddar cheese at different stages of ripening. *Int. J. Dairy Technol.* 62(3): 339-347.
- Gutiérrez-Méndez, N., Vallejo-Córdova, B., González-Cordóva, A.F., Nevárez-Moorillón, G.V. y Rivera-Chavira, B. 2008. Evaluation of aroma generation of *Lactococcus lactis* with an electronic nose and sensory analysis. *J. Dairy Sci.* 91:49-57.
- GRANOTEC. 2002. Antioxidantes naturales. Industria de Alimentos. [www.granotec.com](http://www.granotec.com).
- Hajirostalmloo, B. 2010. Bioactive components in milk and dairy product. *Engineering and Technology.* 72:162-167.
- Halliwell B. y Gutteridge, J.M.C. 1998. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford, UK
- Haque, E. y Chand, R. 2006 .Milk protein derived bioactive peptides. [On-line]. Available from: <http://www.dairyscience.info/exploitation-of-anti-microbial-proteins/111-milk-protein-derived-bioactive-peptides.html?showall=1>  
.Accessed: 3 November, 2011
- Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B. y Amigo, L. 2005a. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *J Agric Food Chem.* 53: 588–593.
- Hogan, S., Zhang, L., Li, J., Wang, H. y Zhou, K. 2009. Development of antioxidants rich peptides from milk protein by microbial proteases and analysis of their effects on lipid peroxidation in cooked beef. *Food Chemistry.* 117: 438-443.
- Hu, M., McClements, D. J., & Decker, E. A. 2003. Lipid oxidation in corn oil-in-water emulsions stabilized by casein, whey protein isolate, and soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 51: 1696–1700.

- Jain, S., Yadav, H., Sinha., P.R. 2009. Antioxidant and cholesterol assimilation activities of selected lactobacilli and lactococci cultures. *J. Dairy Res.* 76: 385-391.
- Jensen, P. R. y Hammer, K. 1993. Minimal requirements for exponential growth of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:4363–4366.
- Kitts, D.D. y Weiler, K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Application of bioprocesses used in isolation and recovery. *C. Pharmaceutical Des.* 9(16): 1309-1323.
- Kudoh, Y., Matsuda, S., Igoshi, K. y Oki, T. 2001. Antioxidative peptide from milk fermentes with *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* IFO13953. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi.* 48: 44-55.
- Kuskoski, M.E., Asuero, A.G., Troncoso, A. M., Mancini -Filho, J. y Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos par a determinar actividad antioxidante en pulpa de f rutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 25(4): 726-732
- Larrauri, J.A., Sánchez-Moreno, C. y Saura-Calixto, F. 1998. Effect of Temperature on the Free Radidal Scavenging Capacity of Extracts from Red and White Grade Pomace Peels. *J. Agric. Food Chem.* 46: 2694-2697.
- Leroy, F., V. y De Vuyst, L. 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International. J. of Food Micro.* 106: 270-285.
- Liu, H. C., Chen, W. L. y Mao, S.J.T. 2007. Antioxidant Nature of Bovine Milk  $\beta$ -Lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* 90:547–555
- Lozada, S.M. y García, L. 2009. Estrés oxidativo y antioxidantes: como manter el equilibrio. *Rev Asoc Colomb Dermatol.* 17: 172- 179.
- McDonald-Wicks, L.K. , Wood, L.G. Garg, M.L. 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *J Sci Foof Agric.* 2046-56.
- Min D.B y Boff J.M. 2002. Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* Institute of Food Technologists. 58- 69.

- Muguerza, B., Ramos, M., Sánchez, E., Manso, M., Miguel, M., Aleixandre, A., Delgado, M. y Recio, I. 2006. Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *Int. Dairy Sci.* 16:61-69.
- Niva, M. 2007. "All foods affect health": Understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns. 48: 384–393.
- Peng, X.; Xiong, Y. L.; Kong, B. 2009. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. *Food Chem.* 113: 196–201.
- Picariello, G., Ferranti, P., Fierro, O., Mamone, G., Caira, S., Di Luccia, A., Monica, S., Addeo, A. J. 2010. Peptides surviving the simulated gastrointestinal digestion of milk proteins: Biological and toxicological implications *J. Chromatogr.* 878: 295–308
- Picon, A. García-Casado, M.A. Nuñez, M. 2010. Proteolytic activities, peptide utilization and oligopeptide transport systems of wild *Lactococcus lactis* strain. *International Dairy J.* 20: 156- 162.
- Pihlanto-Leppälä, A. 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Int. Dairy J.* 16: 1306-1314.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N. y Gordon, M. 2001. Antioxidants in food: Practical applications. CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- Prodelalova, J; Španová, A; Rittich, B. 2005. Application of PCR, rep-PCR and RAPD Techniques for Typing of *Lactococcus lactis* strains. *Folia Microbiol.* 50 (2), 150–154.
- Qian, B., Xing, M., Cui, L., Deng, Y., Xu, Y., Huang, M. y Zhang, S. 2011. Antioxidant, antihypertensive, and immunomodulatory activities of peptide fraction from fermented skim milk with *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* LB340. *J. Dairy Research.* 78: 72-79.
- Re, R., Pellegrini, N. Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decoloration assay. *Free Radical Bio. Med.* 26 (9): 1231-1237.
- Reyes, R. 2010. Determinación de compuestos volátiles responsables del aroma a queso fresco producidos por *Lactococcus lactis*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Hermosillo, Sonora.

- Rodríguez-Figueroa, J.C., Reyes-Díaz, R., González-Córdova, A., Troncoso-Rosas, R., Vargas-Arispuro, I. y Vallejo-Córdoba, B. 2010. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk fermented by wild and fermented milk of *Lactococcus lactis*. J. of Dairy Sci.
- Rodríguez-Figueroa, J.C. 2008. Evaluación de la actividad antihipertensiva en leches fermentada con cepas de *Lactococcus lactis* en diversos nichos. CIAD. Mexico.
- Rodríguez Perón, J.M., Menéndez, J.R. y Trujillo, Y. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés. Rev Cubana Med Milit. 30(1):36-4.
- Saabena, K.H., Baron, C.P., Skall, N., Jackobsen, C. 2010. Antioxidant activity of yogurt peptides: Part 1: In vitro assays and evaluation  $\omega$ -3 enriched milk. Food Chemistry. 123:1081-1089.
- Sadat, L., Cakir-Kiefer, C., N'Negue, M. A., Gaillard, J.L. 2011. Isolation and identification of antioxidative peptides from bovine  $\alpha$ -lactalbumin. International Dairy J. 21: 214- 221.
- Sarmadi, B. H. e Ismail, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. Peptides. 31: 1949- 1956.
- Sarmiento-Rubiano, L.A. 2006. Alimentos funcionales, una nueva alternativa de alimentación. Colombia. ORINOQUIA. V. 10. N° 1.
- Segura-Campos, M.R., Chel-Guerrero, L.A. y Betancur-Ancona, D.A. 2010(a). Péptidos bioactivos como promotores de salud. <http://www.alfaeditores.com/web>.
- Segura-Campos, M.R., Chel-Guerrero, L.A. y Betancur-Ancona, D.A. 2010(b). Efectos de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. Rev Chil Nutr. 37: 386 – 391.
- Serna, L. y Naranjo, J.E. 2005. Producción de ácido láctico por una mezcla de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus salivaris* en fermentaciones en discontinuo. Rev. Colombiana de Biotecnología. 7: 32- 37.
- Severin, S., and X. Wenshui. 2005. Milk biologically active components as nutraceuticals: review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 45:645-656.
- Shah, N. P. 2000. Effects of milk-derived bioactives: an overview. British J. of Nutrition. 84:1: S3±S10.

- Silva-Hernández, E. R. y Verdalet Guzmán, I. 2003. Revisión: Alimentos e ingredientes funcionales derivados de la leche. ALAN. 53 (4): 333-347.
- Silveira-Rodríguez, M.B., Monereo-Megías, M. y Molina-Baena, B. 2003. Alimentos funcionales y nutrición óptima. ¿cerca o lejos?. Rev Esp Salud Pública. 77: 317-331.
- Teuber, M. 1995. The Genus *Lactococcus*. The genera of lactic acid bacteria. Blackie academic and Prof. London. 173-234.
- Teuber, M. y Geis, A. 2006. Prokaryotes The Genus *Lactococcus*. 1.2.7. 4:205–228
- Topisirović, L., Veljović, K., Terzić Vidojević, A., Strahinić, I. y Kojić, M. 2007. Comparative analysis of antimicrobial and proteolytic activity of lactic acid bacteria isolated from zlatar cheese. Genetic. 39 (2):125 -138.
- Torres-Llenez, M.J., Vallejo-Córdoba, B. y González-Cordova, A.F. 2005. Peptidos bioactivos derivados de la leche. Archivos latinoamericanos de nutrición. 55:2.
- Vargas, F., Rivas, C., Nursamaa, A., Zoltan, T. 2007. Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. Redalyc. Avances en Química. 2 (2): 3- 15.
- Venéreo, J.R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Revista Cubana de medicina militar. 31(2): 126-133.
- Vidal-Carou, M.C. 2008. Alimentos funcionales. Rev. HUMANITAS Humanidades Médicas. 24:1-27.
- Vioque, J. y Millán, F. 2001. Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud. Grasas y Aceites. 2-5.
- Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S. y Korhonen H. 2006. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. Journal of Appl. Micro. 102: 106–115.
- Visser, F. y Groot-Mostert, A. 1977. Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavor development in Gouda cheese. Netherlands Milk Dairy J. 31: 247- 264.

- Visser, W. 1993. Proceedings of the Workshop of the Thirteenth International Joint Conference on Artificial Intelligence "Reuse of designs: an interdisciplinary cognitive approach. Chambéry, France.
- Wang, W. y González de Mejía, E. 2005. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Sci. and Food Safety*. 4: 63-78.
- Yuh-Hwa, L., Wen-Chun, W., Yeh-Lin, L., Ying-Jang, L. y Wen-Chi H. 2010. Antioxidant and Amine Oxidase Inhibitory Activities of Hydroxyurea. . *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 74 (6).1256-1260.
- Yuleivys, O. y Vega, S. 2004. Péptidos bioactivos derivados de las proteínas lácteas: propiedades y aplicaciones principales. *Revista de Salud Animal*, 26(3): 151-162.