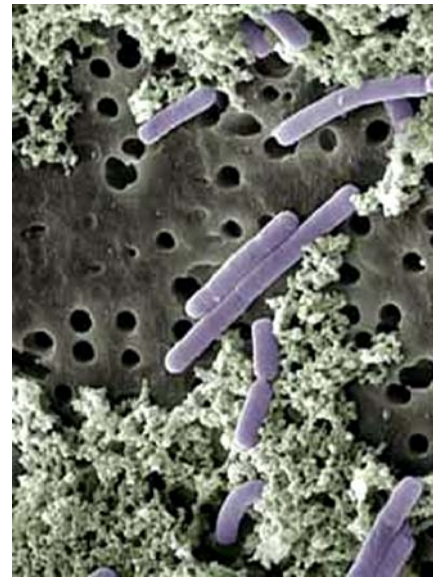


Formación de Péptidos Bioactivos por BÁL (Bacterias Ácido Lácticas) en Quesos y Suero de Quesería

Los péptidos liberados por las proteínas alimentarias durante la fermentación tienen importancia en la salud ya que pueden propiciar numerosas respuestas fisiológicas en el organismo.



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

La degradación de las proteínas lácteas por proteasas permite la formación de péptidos y aminoácidos, los cuales actúan como compuestos de sabor o como precursores de compuestos del sabor. Sin embargo, los péptidos liberados de las proteínas alimentarias durante la fermentación, también tienen importancia en la salud ya que pueden propiciar numerosas respuestas fisiológicas en el organismo. Estos péptidos bioactivos pueden ser liberados durante la elaboración de productos lácteos. Las BAL son conocidas por poseer una variedad de enzimas proteolíticas capaces de utilizar las proteínas como una fuente de nitrógeno para garantizar su crecimiento durante la fermentación.

Las BAL son utilizadas en la salud humana ya que su ingestión puede proteger contra varias infecciones virales estimulando al sistema inmune. En el mismo campo de interés, ha sido mostrado que éstas actúan en la prevención de cáncer de colon. Los cultivos iniciadores utilizados en la industria láctea son altamente proteolíticos. Además de las proteinasas enlazadas a la pared celular, al menos 16 peptidasas de BAL han

sido identificadas y caracterizadas genéticamente. Este sistema provee un mecanismo de transporte específico para aminoácidos, di- y tripéptidos y oligopéptidos liberados de la molécula proteica. En el tracto intestinal, las enzimas digestivas endógenas y las proteasas liberadas por microorganismos colonizadores del intestino, pueden degradar oligopéptidos permitiendo una posible formación de péptidos con bioactividades específicas. Una vez liberados en el intestino, estos péptidos pueden actuar localmente o pasar a través de la pared intestinal a la circulación sanguínea y alcanzar los órganos, con la subsiguiente regulación fisiológica.

Los CPPs se pueden formar durante la maduración del queso debido a las proteasas (3-4). La presencia de péptidos con actividad antihipertensiva de varios alimentos se debe a que actúan inhibiendo la ECA. Laffineur y col. mostraron que las BAL son capaces de liberar péptidos de β -CN con actividad inmunomoduladora.

Un estudio realizado por Pihlanto-Leppälä y colaboradores mostró que los cultivos iniciadores de bacterias ácido lácticas fueron capaces de producir péptidos con actividad inhibitoria de ECA solo después de la digestión de la α -LA y la β -LG, con pepsina y tripsina.

Otros péptidos con potente actividad inhibitoria que no habían sido reportados provinieron de la β -CN y de la α s1-CN. En un estudio similar, se detectaron péptidos obtenidos de leche fermentada con *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*, conteniendo la secuencia de β -lactofina.

Recientemente, diferentes tipos de quesos como el Gouda, han sido utilizados como fuente de péptidos con actividad antihipertensiva. Similarmente, algunos péptidos antihipertensivos como las β -casomorfina, fueron aislados de quesos enzimáticamente modificados.

Como se ha mencionado con anterioridad, la hidrólisis de las proteínas de la leche con proteinasas de BAL produce péptidos bioactivos. El efecto sobre las características sensoriales y químicas que causa el inocular la leche con cultivos iniciadores ha sido ensayado en diferentes tipos de quesos. Sin embargo, son pocos los datos disponibles acerca del papel que desempeñan los diferentes cultivos iniciadores sobre la producción de péptidos bioactivos. En el estudio realizado por Gómez-Ruiz y col. se determinó que la actividad inhibitoria de ECA incrementó con la proteólisis hasta el octavo mes de maduración y empezó a disminuir a los doce meses de maduración del queso Manchego. En este estudio un total de 22 fragmentos de péptidos fueron identificados en nueve fracciones.

No solo los quesos son fuentes de péptidos bioactivos, sino también el suero derivado; esto último toma particular importancia debido al incremento del suero como subproducto de la industria quesera. El suero de bovino contiene proteínas unidas a metales, inmunoglobulinas, factores de crecimiento y hormonas. A varias proteínas del suero se le han atribuido propiedades fisiológicas. Sin embargo, los péptidos bioactivos del suero y sus efectos fisiológicos han sido menos estudiados que los obtenidos de las caseínas. Varios estudios han encontrado secuencias de péptidos con actividad antihipertensiva en proteínas séricas de leche utilizando enzimas digestivas o microbianas o combinación de ambas. Los péptidos antihipertensivos también han sido obtenidos por la digestión de proteínas del suero de queso con proteinasa K,

obteniéndose un tripéptido a partir de la β -LG. Los productos fermentados que presentan péptidos inhibidores de ECA tienen un gran potencial como alimentos funcionales para la prevención de hipertensión.

Algunos de los péptidos obtenidos de proteínas séricas son α -lactorfina, β -lactorfina, albutensina A y β -lactensina. Las serorfinas obtenidas de albúmina sérica de bovino presentan actividad opioide. Los péptidos, α -lactorfina, β -lactorfina causan la contracción del músculo liso similar a la causada por morfina. La literatura menciona que las principales actividades bioactivas del suero son, por un lado, su actividad anticancerosa y, más concretamente, su papel protector frente al cáncer de colon, y por otro lado, su papel como estimulador de la respuesta inmune.

En un estudio realizado en queso Emmental se encontró que Catepsina D y proteinasas celulares podrían actuar competitivamente en la degradación de caseínas durante la maduración. Se señala que además de la acción de las proteinasas nativas de la leche, los lactobacilos termofílicos presentan un rol significativo en la proteólisis del queso a través de la acción de sus proteinasas celulares. Estos microorganismos son considerados la especie bacteriana más activa durante la maduración, no solamente debido a su alta actividad proteolítica, sino también debido a su actividad autolítica. Este estudio, también informa que algunas regiones de las caseínas no fueron hidrolizadas, aún cuando eran sitios de ruptura potenciales de las diferentes proteinasas de los lactobacilos, lo que podría estar relacionado a la modulación de la especificidad de las enzimas del queso por las condi-



"Soluciones para empaque al alto vacío y atmósfera modificada"

- Termoformadoras.
- Máquinas de campana.
- Termoselladoras de Charolas.
- Servicio Técnico altamente especializado.
- Financiamiento de su equipo.



contacto@multivac.com

			
<p>MÉXICO Av. Santa Fé No. 170 Of. 044 Col. Lomas de Santa Fé México, D.F. 01210 Tel: +(55) 5020-5555 Fax: +(55) 5020-5560 contacto@multivac.com</p>	<p>MONTERREY Blyd. Puerta del Sol #767 loc. 2 Col. Colinas de Sn. Jerónimo Mty., Nuevo León C.P. 64630 Tel. (81) 1492-4800 Tel. (81) 1492-4801 Fax. (81) 1492-4802</p>	<p>GUADALAJARA Gardenia No. 321 Col. Guadalupana Tlaquepaque, Jalisco Guadalajara C.P. 45595 Tel. (33) 3692-8011</p>	<p>TIJUANA Av. Paseo de los Héroes No. 9288-701 Plaza Corporativa Torremol Zona del Río, Tijuana, B.C. C.P. 22320 Tel./Fax +52 (664) 200-2164</p>

ciones fisicoquímicas (pH, actividad de agua, y contenido de minerales y sales) y a la accesibilidad de los sustratos, debido al rearrreglo estructural durante la formación de la matriz caseica y condiciones ambientales en el queso.

Técnicas de aislamiento e identificación de péptidos bioactivos

Los protocolos utilizados para la obtención de péptidos bioactivos consisten en: preparación de extractos acuosos, fraccionamiento por cromatografía por exclusión de tamaño y HPLC en fase reversa o electroforesis capilar. Para la identificación de la secuencia de los péptidos, se ha utilizado la degradación de Edman o la espectrometría de masas en "tandem".

La actividad potencialmente bioactiva de los péptidos es determinada por comparación de las secuencias encontradas con las reportadas de péptidos bioactivos en bases de datos. Aquellos estudios que incluyen la confirmación de la actividad bioactiva de los péptidos *in vivo* o *in vitro*, incluyen a la cromatografía semipreparativa para la obtención de suficiente material para los ensayos biológicos.

Los protocolos antes descritos, han sido los clásicos, en los cuales las separaciones cromatográficas para el aislamiento y purificación se realizan de manera discontinua. Sin embargo, cuando es necesario realizar una gran cantidad de muestras de manera rápida, el procedimiento descrito no resulta eficiente y se le ha considerado "el cuello de botella" para aquellos que buscan la automatización en el análisis de péptidos. Por estas razones, algunos fabricantes de instrumentación analítica se han enfocado a desarrollar plataformas integradas que abordan el problema de reducir el tiempo de análisis, mientras que otros se han enfocado a mejorar etapas específicas del análisis. Para la identificación sistemática de los péptidos constituyentes en un sistema complejo, las herramientas analíticas que permiten la identificación de las mismas en gran escala y con gran rapidez son la cromatografía bidimensional (2D) como técnica de separación, la espectrometría de masas especializada como técnica de identificación de la secuencia de aminoácidos y la bioinformática para comparar la información estructural generada de la espectrometría de masas a través de las bases de datos.

Una metodología que presenta ventajas para la separación de péptidos en dos dimensiones, es la cromatografía capilar de líquidos (2D-LC) con interfase directa con una gran variedad de espectrómetros de masas. Debido a la alta sensibilidad de la LC, y a que todo el análisis es realizado en

fase líquida y en línea, estos sistemas (2D-LC-MS) permiten separar hasta péptidos menos frecuentes.

Anteriormente, los métodos de identificación de proteínas, consistían en la degradación de Edman y el análisis composicional de aminoácidos, sin embargo ambas metodologías son muy laboriosas y requieren de mucho tiempo. La introducción de los métodos de espectrometría de masas reforzó las estrategias de identificación de péptidos y proteínas; especialmente con el desarrollo del espectrómetro de tiempo de vuelo (TOF) y los métodos de ionización suave, incluyendo el de MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) y la ionización por electroesparado (ESI).

En la identificación de la secuencia de los péptidos por medio de la espectrometría de masas, estos son separados usando cromatografía de líquidos o pueden ser analizados directamente por MS. Los péptidos individuales son separados y fragmentados por colisión con un gas inerte dentro del espectrómetro de masas y las masas de los fragmentos derivados son medidas. La información generada de las masas moleculares se compara con valores teóricos de las bases de datos de péptidos para encontrar la secuencia del péptido e identificar a la proteína enlistada de acuerdo con una exactitud medida estadísticamente por un software especializado.

Un método alternativo consiste en la identificación de péptidos usando "tandem" MS y búsqueda en las bases de datos específicas para proteínas. Para este tipo de análisis se utiliza un sistema de cuadrupolo TOF o una trampa de iones. En ambos instrumentos la fragmentación es inducida en una celda de colisión y se miden las masas moleculares de los iones fragmentados. Las masas obtenidas de los iones son comparadas con los valores teóricos de masas de fragmentos de secuencias de proteínas de las bases de datos. Los equipos "tandem" MS en combinación con la cromatografía de líquidos multidimensional permite el análisis eficiente de un gran número de mezclas de péptidos provenientes de la digestión de varias proteínas de sistemas biológicos complejos.

Fuente:

Archivos Latinoamericanos de Nutrición
Venezuela, 2005.
