



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**“AISLAMIENTO DE PÉPTIDOS ANTIHIPERTENSIVOS DERIVADOS DE LA
FERMENTACIÓN DE LECHE Y LACTOSUERO CAPRINO POR LA BACTERIA
L. HELVETICUS”**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL**

P R E S E N T A:

SERGIO JOAO SÁNCHEZ BALCÁZAR

**TUTOR: MSc RENÉ ROSILES MARTÍNEZ
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

COMITÉ TUTORAL:

**PHD ALEJANDRO VILLA GODOY
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA (UNAM)**

**DRA. MARTHA FRANCO GUEVARA
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA (INC)**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Miembros del jurado

Presidente: M.C Ramírez Orejel Juan Carlos

Secretario: MSc Rosiles Martínez René

Vocal: M.C Nava Cuellar Cuauhtémoc

Vocal: Dra. Figueroa García María del Consuelo

Vocal: Dra. Franco Guevara Martha

Dedicatorias

A mis padres María del Carmen Balcázar y Marcos Sánchez por todo el apoyo que me brindaron durante mi formación académica y por enseñarme el amor y respeto por los animales.

A mis abuelos que ya no están con nosotros; este logro es para ustedes.

A toda mi familia: a mi abuela, tíos, y hermanas por su apoyo, confianza y amor incondicional. Gracias a ustedes he cumplido con cada objetivo personal, laboral y educativo que me he planteado.

A cada una de mis mascotas que gracias a ellos es que me decidí por esta carrera que me apasiona.

A los animales con lo que trabaje en toda mi formación académica y durante mi carrera laboral, gracias a ellos me hice una mejor persona y esta tesis la hice pensando en ellos para ser un mejor médico veterinario el cual pueda afrontar los problemas de la vida laboral.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por ser los responsables de mi formación y por pertenecer a una de las universidades más importantes a nivel mundial

Al departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la FMVZ por permitirme realizar en sus instalaciones las pruebas necesarias para realizar mi experimento

Al Dr. René Rosiles por su apoyo durante su tutoría, por todos los regañones, buenos momentos y consejos otorgados durante el desarrollo de este proyecto.

Al QFB Alejandro Camacho responsable del Cepario de la Facultad de Química UNAM por su paciencia, enseñanza y gran ayuda para el desarrollo de los microorganismos utilizados durante este experimento.

A la MVZ Arely Quezada Ascencio por toda la ayuda y por nunca dejarme desistir en mi propósito de realizar la maestría así como a toda tu familia a la que considero mi segunda familia.

Al Dr. Alejandro Villa Godoy por sus consejos, observaciones y orientación que me brindo para la realización de este proyecto.

A la Dra. Martha Franco Guevara por su orientación y disposición en todo momento para la realización de este proyecto

A los doctores del jurado calificador: Juan Carlos Ramírez Orejel, René Rosiles Martínez, Cuauhtémoc Nava Cuellar, María Del Consuelo Figueroa García y Martha Franco Guevara.

A mi familia por la ayuda que día a día me brindaron para la realización de este proyecto, por ser un cimiento importante en mi vida, por inculcarme la tenacidad en la realización de cualquier objetivo. Y a todos los compañeros que transitaron junto conmigo en esta maestría, por darme y aceptar siempre un consejo sincero.

Resumen

Los alimentos lácteos fermentados tienen una gran variedad de efectos positivos en la salud. Para este estudio se usaron dos bacterias ácido lácticas *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus casei* para fermentar dos sustratos, leche y lactosuero de origen caprino. Se formaron 4 grupos: leche caprina fermentada con *L. helveticus*, lactosuero caprino fermentado con *L. helveticus*, leche caprina fermentada con *L. casei*, lactosuero caprino fermentado con *L. casei*, se tomaron muestras de cada grupo a las 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas post inoculación. El objetivo del estudio fue determinar el porcentaje de inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) en leche y lactosuero caprino fermentado con dos diferentes cepas de lactobacilos *in vitro*. A cada muestra le fue medido el pH; la medición del porcentaje de inhibición de ECA *in vitro* se midió espectrofotométricamente a 228 nm con Hipuril-Histidil-Leucina (HHL) como sustrato y liberación de ácido hipúrico con el método de Cushman y Cheung (1971). Los resultados muestran que la mayor actividad inhibitoria se alcanzaba a las 36 horas post inoculación ($p < 0.05$) con valores en la leche de 85.2 ± 0.80 % de inhibición de ECA para *L. helveticus* y 81 ± 0.48 % para *L. casei* de después de las cuales hay una disminución significativa hacia el final del tiempo de incubación. Hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los fermentados de lactosuero con los diferentes lactobacilos encontrando el punto de inhibición más alto a las 24 horas siendo *L. helveticus* la más eficaz disminuyendo la ECA. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con los resultados de la efectividad de los bacilos utilizados respecto al sustrato; siendo más eficaz *L. helveticus* en leche (en promedio 1.5 veces mayor) y en lactosuero (de 0.8 a 2.5 veces mayor). En cuanto al pH la bacteria que más disminuyo el pH fue *L. helveticus* en sustrato leche.

Palabras clave: ECA, *L. helveticus*, *L. casei*, leche, lactosuero, alimentos lácteos fermentados.

Abstract

Fermented dairy foods have a wide variety of positive health effects. For this study two lactic acid bacteria *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus casei* were used to ferment two substrates, milk and whey of goat origin. Four groups were formed; milk goat fermented with *L. helveticus*, goat whey fermented with *L. helveticus*, goat milk fermented with *L. casei*, goat whey fermented with *L. casei*, samples were taken from each group at 12, 24, 36, 48, 60 and 72 hours post inoculation. The aim of the study was to determine the percentage of inhibition of the Angiotensin Converting Enzyme (ACE) in milk and goat whey fermented with two different strains of lactobacilli *in vitro*. The pH was measured for each sample, the measurement of the percentage of ACE inhibitors *in vitro* was measured spectrophotometrically at 228 nm with Hippuryl-Histidyl-Leucine (HHL) as substrate and release of hippuric acid, by the method of Cushman and Cheung (1971). The results show that the highest inhibitory activity was reached at 36 hours post inoculation ($p < 0.05$) with values in milk of $85.2 \pm 0.80\%$ ACE inhibition for *L. helveticus* and $81 \pm 0.48\%$ for *L. casei*, after which there is a significant decrease towards the end of the incubation time. There are statistically significant differences ($p < 0.05$) between fermented whey with different lactobacilli finding the highest point of inhibition at 24 hours with *L. helveticus* being the most effective, decreasing the ACE.. Statistically significant differences were found ($p < 0.05$) with the results of the effectiveness of the bacilli used with respect to the substrate, being *L. helveticus* more effective in milk (on average 1.5 times higher) and in whey (0.8 to 2.5 times higher). In terms of pH, the bacterium that most decreased pH was *L. helveticus* in milk substrate.

Keywords: ACE, *L. helveticus*, *L. casei*, milk, whey, fermented dairy foods.

Contenido

1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Hipertensión	2
2.1.1 La presión arterial e hipertensión	2
2.1.2 Regulación de la presión arterial	4
2.1.3 Sistema Renina-Angiotensina	5
2.1.4 Función y estructura de la ECA.....	7
2.1.5 Hipertensión y complicaciones	8
2.1.6 Tratamiento de la hipertensión	8
2.2 Mecanismos de reducción de la presión arterial.....	9
2.3 Alimentos funcionales.....	10
2.4 Fuentes de péptidos bioactivos	12
2.5 Leche de cabra.....	13
2.5.1 Proteínas de la leche de cabra	13
2.5.2 Caseínas en leche de cabra.....	14
2.5.3 Proteínas del lactosuero.....	15
2.6 Bacterias ácido lácticas.	16
2.6.1 Género <i>Lactobacillus</i>	17
2.6.2 Metabolismo microbiano de la lactosa.....	19
2.6.3 Actividad proteolítica de las Bacterias Acido Lácticas	19
3. Justificación	20
4. Objetivos	21
4.1 Objetivo general.....	21
4.2 Objetivos particulares.	21
5. Hipótesis	21
6. Material y métodos.....	22
6.1 Leche y lactosuero.....	22
6.2 Microorganismos	23
6.2.1 Propagación de <i>L. helveticus</i>	23

6.2.2 Preparación del Pre-inoculo	23
6.3 Fermentación del sustrato	24
6.4 Preparación de las muestras	24
6.5 Medición de la Actividad Inhibitoria de la ECA	25
6.6 Cálculo del porcentaje de Actividad Inhibitoria de la ECA	25
6.7 Análisis estadístico	26
7. Resultados	27
7.1 Comportamiento de los fermentados.....	27
7.2 Fermentados de leche	28
7.3 Fermentados de lactosuero	30
7.4 <i>L. helveticus</i> en diferentes sustratos.....	32
7.5 <i>L. casei</i> en diferentes sustratos	33
7.6 Análisis del pH con respecto al tiempo	34
7.7 Relación pH porcentaje de inhibición.....	35
8. Discusión	38
8.1 Porcentaje de Inhibición de la ECA	38
8.2 pH e inhibición de la ECA.....	39
8.3 Tiempo y eficacia de fermentados	40
8.4 Péptidos y aminoácidos.....	40
8.5 Enzimas e hidrolizados.....	41
8.6 Otros Sustratos.....	42
8.7 Lactosuero.....	43
8.8 Ensayos <i>in vivo</i>	43
9. Conclusiones	46
10. Referencias.....	48

Lista de cuadros

Cuadro 1. Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) por los fermentados de leche caprina con <i>L. helveticus</i> y <i>L. casei</i> (%).....	28
Cuadro 2. Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) por los fermentados de lactosuero caprino con <i>L. helveticus</i> y <i>L. casei</i> (%).....	30

Lista de Figuras

Figura 1. Comportamiento de la inhibición de la ECA de los diferentes fermentados lácteos respecto al tiempo (%).....	27
Figura 2. Inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) de los fermentados de leche (%).....	29
Figura 3. Inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) de los fermentados de lactosuero (%).....	31
Figura 4. Inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) de los fermentados de leche y lacto-suero con el lactobacilo L helveticus (%).....	32
Figura 5. Inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) de los fermentados de leche y lacto-suero con el lactobacilo L casei (%).....	33
Figura 6. Comportamiento del pH de los diferentes fermentados respecto al tiempo.....	34
Figura 7. Relación del pH de los diferentes fermentados con respecto al porcentaje de inhibición.....	36
Figura 8. Efecto de la cepa y el tiempo de incubación en el porcentaje de inhibición de la ECA.....	37

Abreviaturas y siglas

ECA Enzima convertidora de angiotensina

H-H-L Hipuril Histidil Leucina

AH Acido Hipúrico

BAL Bacteria Ácido Láctica

pH Potencial de Hidrogeno

VPP Valin Prolin Prolina

nm Nanometro

μm Micrometros

μM Micromolar

mM Milimolar

1N 1 Normal

UFC unidades formadoras de colonias

ATP trifosfato de adenosina

mmHg milímetros de mercurio

MRS Mann Rogosa Sharpe

CO₂ Bióxido de Carbono

rpm revoluciones por minuto.

1. Introducción

En los productos lácteos de mamíferos domésticos (vaca, cabra y borrega) se han identificado a través de diversos estudios péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche, los cuales tienen un efecto reductor de la presión sanguínea (Möller et al., 2008). De estos péptidos se ha estudiado su biodisponibilidad, los efectos fisiológicos potenciales y la existencia de otros mecanismos de acción en la reducción de la presión (Parvez et al., 2006). El contenido del presente estudio está dirigido a probar la actividad de los fermentados derivados de la leche y lactosuero los cuales han mostrado efectos inhibitorios de la ECA.

La enzima convertidora de angiotensina (ECA), es una exopeptidasa que rompe enlaces de varios oligopéptidos por su lado C-terminal como parte del sistema Renina- Angiotensina; hidrolizando un decapeptido inactivo llamado angiotensina I para formar un potente vasoconstrictor llamado angiotensina II, así como también forma parte del sistema cinina-caliceína al hidrolizar a la bradiquinina inhibiendo su acción vasodilatadora (Hersch, 1983)

Los trabajos experimentales involucran la determinación *in vitro* de la actividad inhibitoria sobre la ECA de hidrolizados de proteína de leche. Estos hidrolizados se obtienen por digestión enzimática o fermentación microbiana, seguido por la identificación de estructuras peptídicas y la síntesis química de los péptidos activos potenciales, o de sus análogos en espera de confirmar su actividad (Meisel, 1997).

Con el fin de facilitar la determinación de la inhibición de la ECA por medio de fermentados, el establecimiento de un simple, sensible y fiable ensayo *in vitro* de inhibición de la ECA es deseable. De entre todos los métodos, la espectrofotometría de Cushman y Cheung es la más comúnmente usada (Cushman y Cheung 1971).

Se ha observado que pueden surgir diferencias entre los resultados de los distintos estudios de investigación, lo cual es causado por el uso de diferentes sustratos o bien, en el mismo ensayo debido al uso de diferentes condiciones de prueba o ECA de diferentes orígenes (Meisel, 1997).

2. Antecedentes

2.1 Hipertensión

La hipertensión es un problema de salud común en todos los países occidentales, es un importante factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares, incluyendo enfermedad coronaria, enfermedad arterial periférica y accidente cerebrovascular. Por lo tanto la hipertensión no tratada, puede causar problemas de salud significativos y costos significativos para la sociedad.

A nivel mundial se estima que existen más de mil millones de personas con hipertensión. En México, se habla de 30 millones de personas que padecen esta enfermedad. De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 (ENSANUT 2016) uno de cada 4 adultos en México padecen hipertensión arterial (25.5%) (Presión arterial mayor a 140/90 mmHg).

De acuerdo a esta misma encuesta la hipertensión se presenta ligeramente más en mujeres (26.1%) que en hombres (24.9%). El grupo de edad menos afectado es el de 20 a 29 años, mientras que la prevalencia más alta está en el grupo de 70 a 79 años. No se observó diferencia significativa en la presencia de hipertensión entre regiones de la república mexicana o por tipo de localidad (zona rural o urbana).

2.1.1 La presión arterial e hipertensión

El gasto cardíaco y la resistencia periférica total son los factores que determinan la presión arterial; en la hipertensión el gasto cardíaco, la resistencia periférica o

ambos están elevados, el aumento del volumen de líquido y aumento de la estimulación del sistema nervioso simpático del corazón aumentan el rendimiento cardíaco; sin embargo en la mayoría de los sujetos hipertensos el hallazgo hemodinámico típico es el gasto cardíaco normal y la resistencia vascular periférica elevada (Cowley, 1992). Se desconoce el agente etiológico de la hipertensión en el 95% de los casos (hipertensión esencial); se ha estimado que los factores genéticos representan aproximadamente el 30% de la variación de la presión arterial y los sujetos con uno o dos padres hipertensos tienen el doble de riesgo de padecer hipertensión que los sujetos sin este antecedente genético (Beevers et al., 2001).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Sociedad Internacional de Hipertensión (SIH) en el 2003 definieron los valores normales de la presión arterial como una presión arterial sistólica inferior a 130 mmHg y una presión arterial diastólica inferior a 85 mmHg. Los valores de presión arterial de 140-159 mmHg (sistólica) y 90-99 mmHg (diastólica) se definen como hipertensión leve (Whitworth 2003). La Sociedad Europea de Hipertensión (SEH) y la Sociedad Europea de Cardiología (SEC) tienen la misma definición para la presión arterial normal que la OMS y SIH y definen una presión arterial sistólica de 140-159 mmHg y una presión arterial diastólica de 90-99 mmHg como hipertensión grado 1 (Mancia et al., 2007). Por otra parte, el Comité Nacional Conjunto (JNC 7) define la presión arterial sistólica normal como inferior a 120 mmHg y diastólica como inferior a 80 mmHg. En el séptimo informe del Joint National Committee (JNC), la hipertensión se ha dividido en dos etapas: La etapa 1 la cual refiere valores de presión arterial sistólica de 140-159 mmHg o valores diastólicos de 90-99 mmHg, mientras que la etapa 2 tiene valores de presión arterial sistólica de más de 160 mmHg o valores diastólicos de más de 100 mmHg (Chobanian et al., 2003).

2.1.2 Regulación de la presión arterial

En condiciones normales, los riñones desempeñan un papel central en la regulación a largo plazo de la presión arterial, mientras que el sistema nervioso central actúa principalmente como un regulador de corto plazo (Wyss y Carlson 1999). El sistema nervioso central modula la presión sanguínea controlando el gasto cardíaco y la resistencia periférica los barorreceptores arteriales situados en el arco carotídeo y los senos aórticos junto a los barorreceptores cardiopulmonares son los dos arcos reflejos neurales más importantes implicados en la regulación de la presión arterial (Grassi et al., 1998). Cuando la presión sanguínea aumenta los barorreceptores aórticos responden agudamente mediante la activación parasimpática y la inhibición simpática. La activación del barorreceptor disminuye a medida que disminuye la presión arterial; cuando las señales aferentes de los barorreceptores entran en el centro vasomotor del bulbo raquídeo en el tronco encefálico, las señales eferentes son transferidas a través de los nervios simpáticos al corazón, la vasculatura y los riñones y la señal es mediada por la noradrenalina y la adrenalina de las glándulas suprarrenales. Ambas catecolaminas actúan uniéndose a receptores adrenérgicos (RA) clasificados como α 1- RA, α 2-RA o β -RA. Se sabe que la familia α 2-RA afecta la vasodilatación y la vasoconstricción, estando la respuesta mediada por uno de los tres subtipos de receptores, todos ellos presentes en el cerebro, los riñones, el corazón y la vasculatura. La activación de α 2A-RAs en el cerebro disminuye la presión sanguínea y los niveles plasmáticos de noradrenalina, mientras que la activación de α 2B-RAs periféricas causa retención de sodio y vasoconstricción; la activación de los α 2C-RAs periféricos causa la vasoconstricción inducida por el frío (Kanagy 2005).

Los riñones responden a cambios en la presión sanguínea alterando la excreción de sodio y agua, controlando así el volumen de líquido extracelular (Lohmeier 2001). En condiciones normales cuando la presión arterial se eleva, la excreción de sodio y agua se incrementa hasta que el volumen sanguíneo se reduce

suficientemente para devolver la presión arterial a un nivel normal. A largo plazo, la presión arterial normal puede mantenerse mediante la modulación de la relación presión-natriuresis. Si la relación entre la excreción de sodio y la presión arterial se restablece y se desplaza a presiones más altas, se desarrolla hipertensión (Navar, 1997). El sistema renina-angiotensina (SRA) puede modificar la sensibilidad de este sistema de presión-natriuresis, un aumento en la ingesta de sodio suprime el SRA que aumenta la capacidad de los riñones para excretar sodio y agua (2001).

2.1.3 Sistema Renina-Angiotensina

El SRA es un importante regulador de la presión arterial y el equilibrio de líquidos y electrolitos (Brown y Vaughan 1998, Schmieder et al., 2007). Durante los últimos años se ha puesto de manifiesto que el SRA, que originalmente se consideraba un sistema circulatorio de hormonas, también se localiza en tejidos como el cerebro, los riñones, la corteza suprarrenal, el corazón, la pared de los vasos sanguíneos y el tejido adiposo (Bader et al., 2001, Kramkowski et al., 2006). En el plasma el SRA se determina como un sistema circulatorio de la hormona que regula cambios agudos en el sistema cardiovascular; en los tejidos el SRA regula los cambios a largo plazo.

La enzima limitante de la SRA es la renina, que es secretada por las células yuxttaglomerulares en el riñón. La secreción de renina está regulada por la presión de perfusión renal, el sodio y la actividad nerviosa simpática (Hackenthal et al., 1990). En la circulación la renina produce al decapeptido angiotensina I (Ang I) a partir de angiotensinógeno derivado del hígado. La ECA produce el potente vasoconstrictor octapéptido angiotensina II (Ang II) del vasoconstrictor débil Angiotensina I, ECA también se llama cininasa II la cual cataliza la degradación de la bradiquinina vasodilatadora.

La bradiquinina es un nonapéptido formado a partir de cininógenos los cuales son producidos principalmente por hepatocitos. La bradiquinina dilata los vasos sanguíneos al estimular la producción de óxido nítrico (ON), prostaciclina (PGI₂) y factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) en el endotelio vascular (Su, 2006). También tiene efectos relajantes directos sobre el músculo liso vascular a través del receptor B₂ (Berguer et al., 1993).

La angiotensina II es un fuerte vasoconstrictor directo que induce la liberación de aldosterona y por lo tanto reduce la excreción de sodio y aumenta la presión arterial. Aumenta la actividad del sistema nervioso simpático aumentando la liberación de noradrenalina en la vasculatura causando vasoconstricción (Ardaillou 1997). La angiotensina II también posee propiedades proinflamatorias que se ha enfatizado en el desarrollo de complicaciones, particularmente las asociadas con hipertensión (Mervaala et al., 2000). Los efectos de la angiotensina II están mediados por los receptores de Angiotensina II tipo 1 (AT₁) y tipo 2 (AT₂) (De Gasparo et al., 2000).

Los receptores AT₁ están localizados en las células del músculo liso vascular, el cerebro, el corazón, los riñones y la corteza suprarrenal. La mayoría de los efectos cardiovasculares conocidos de la angiotensina II están mediados por receptores AT₁ (Crowley et al., 2007). La activación de los receptores AT₁ activa la fosfolipasa C e inhibe la adenilato ciclasa y, por lo tanto, aumenta los niveles de calcio intracelular en las células del músculo liso vascular (Orlov et al., 1993), (de Gasparo et al., 2000). La angiotensina II causa vasoconstricción también estimulando la formación de un vasoconstrictor la endotelina-1 (ET-1) en células endoteliales (Sung et al., 1994; Palatini 2001).

Los receptores AT₂ se expresan en niveles bajos en el sistema cardiovascular adulto y se ha sugerido que los receptores AT₂ antagonizan los efectos cardiovasculares de la angiotensina II mediado a través de receptores AT₁ (Burnier 2001). La vasodilatación inducida por el receptor AT₂ está mediada a

través de guanosín monofosfato cíclico (cGMP), disminuyendo así la concentración de calcio intracelular (Savoia et al., 2006).

Los efectos nocivos son mediados por los receptores AT1 y conducen al daño de los órganos finales (corazón, riñones, cerebro, ojo y paredes de vasos sanguíneos) en la hipertensión promoviendo la inflamación, la fibrosis y el daño vascular y estimulando la producción de especies reactivas del oxígeno. Este daño puede ser reducido por los bloqueadores de los receptores AT1 y los inhibidores de la ECA (Muller et al., 2000, Luft 2001, Crowley et al., 2006).

2.1.4 Función y estructura de la ECA

La ECA (quininasa II) también llamada dipeptidil carboxipeptidasa I es una metaloglicoproteína ligada a la membrana, con una masa molecular relativa de 150000 Da y un punto isoeléctrico de 4.5; la enzima escinde un residuo dipeptídico del extremo carboxiterminal de la angiotensina I, así como de la bradiquinina (Hersch LB, 1983).

Está constituida por una sola cadena polipeptídica con zinc en su centro activo, el cual es imprescindible para su actividad. En presencia de Zn^{2+} , la ACE hidroliza el enlace peptídico de Phe⁸-His⁹ del decapeptido angiotensina I (Ang I) para liberar el octapéptido angiotensina II (Ang II) y el dipéptido C-terminal His-Leu. Al unirse con su receptor tipo 1, Ang II contrae el músculo liso vascular, estimula la secreción de aldosterona y la reabsorción de Na^+ , K^+ en el riñón e induce retención de sodio-agua y aumento del volumen sanguíneo. Estos subsecuentemente resultan por lo tanto en un aumento de la presión sanguínea y el efecto inotrópico positivo y efecto cronotrópico en el corazón (Coates, 2003). El requisito indispensable de cada uno de los sustratos sobre los que actúa la enzima, es el de contar con al menos 3 residuos de aminoácidos.

Los agentes quelantes, los compuestos sulfihidrílicos, los metales pesados y determinados péptidos son inhibidores de ECA.

2.1.5 Hipertensión y complicaciones

Existe una relación clara e independiente entre la presión arterial y los eventos cardiovasculares (ECV). En estudios recientes, se ha demostrado que la variabilidad de la presión arterial es un determinante más importante del daño en los órganos diana (corazón, riñones, cerebro, ojo y paredes de vasos sanguíneos) que la hipertensión arterial en sí misma (Miao et al., 2006; Tatasciore et al., 2007). La proporción de riesgo de enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular, enfermedad arterial periférica e insuficiencia cardíaca es alrededor de 2 a 3 veces mayor en sujetos hipertensos que en sujetos normotensos (Kannel et al., 2004). La hipertensión también se asoció con un riesgo cuatro veces mayor de infarto cerebral aterotrombótico en comparación con la normotensión (Kannel et al., 1996). Los ensayos clínicos han demostrado que en sujetos hipertensos, la reducción de la presión arterial disminuye el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Collins et al., 1990).

2.1.6 Tratamiento de la hipertensión

El objetivo principal del tratamiento de la hipertensión es reducir el riesgo global de morbilidad y mortalidad cardiovascular (Chobanian et al., 2003; Whitworth 2003, Mancia et al., 2007). La modificación del estilo de vida debe incluirse para todos los pacientes, especialmente antes de prescribir la medicación antihipertensiva, y también para los pacientes que requieren tratamiento farmacológico. La modificación del estilo de vida incluye la reducción de peso en sujetos obesos y con sobrepeso, el tratamiento dietético, la actividad física y la moderación en el consumo de alcohol. El peso corporal óptimo se ha determinado como un índice de masa corporal (IMC) de 18,5-24,9, que es el rango para el peso normal. La recomendación para la actividad física es el ejercicio físico aeróbico 30 min por día en la mayoría de los días de la semana, mientras que la ingesta recomendada de alcohol es un máximo de dos bebidas (por ejemplo 720 ml de cerveza o 300 ml de vino) por día para los hombres y una bebida para mujeres. El tratamiento dietético

incluye la restricción de sodio y una dieta para detener la hipertensión (Dietary Approaches to Stop Hypertension, DASH), que contiene gran cantidad de frutas, verduras y productos lácteos bajos en grasa (Appel et al., 1997). Se ha demostrado que la dieta DASH es beneficiosa para la presión sanguínea ya que contiene mucho calcio y potasio (Chobanian et al., 2003).

El tratamiento farmacológico es necesario si los valores de presión arterial deseados no pueden alcanzarse con la modificación del estilo de vida solamente. La reducción de la presión arterial mediante medicación reduce el riesgo de las complicaciones de la hipertensión. Para alcanzar niveles óptimos de presión arterial, algunas personas necesitan dos o incluso más fármacos antihipertensivos. El perfil de riesgo del individuo y la presencia o ausencia de daño de órganos diana influye en la elección de la medicación antihipertensiva. Las principales clases de medicamentos antihipertensivos son los diuréticos, cuyo órgano diana es la nefrona, donde interfieren con la reabsorción de sodio; inhibidores de la ECA, que inhiben la ECA y por lo tanto reducen los niveles circulantes de angiotensina II; bloqueadores del receptor de angiotensina II, que disminuyen la presión sanguínea bloqueando los receptores AT1; bloqueadores de los receptores adrenérgicos (α -bloqueadores, β -bloqueadores): los α -bloqueadores causan una reducción moderada tanto de la resistencia periférica como del gasto cardíaco, los β -bloqueadores inhiben la actividad β -adrenérgica y por lo tanto reducen el gasto cardíaco y el flujo nervioso simpático central; y bloqueadores de los canales de calcio, que reducen el calcio intracelular y, por lo tanto, vasodilatan las células del músculo liso vascular (Chobanian et al., 2003).

2.2 Mecanismos de reducción de la presión arterial

El mecanismo más ampliamente estudiado por el cual los péptidos derivados de la leche pueden reducir la presión sanguínea es la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina ECA (FitzGerald y Meisel, 2000; López-Fandiño et al., 2006).

Se han identificado varios péptidos derivados de los productos lácteos que tienen efectos antihipertensivos, los cuales actúan a través de la inhibición de la ECA. El efecto inhibitor de estos péptidos ha sido estudiado *in vitro* y han sido determinados los valores de CI_{50} (las concentraciones a las que se inhibe la actividad ECA *in vitro* en un 50%) de estos péptidos (Karaki et al., 1990, Nakamura et al., 1995 a y b, Maeno et al., 1996, Yamamoto et al., 1999). Se ha encontrado que los valores de IC_{50} de los tripéptidos Ile-Pro-Pro y Val-Pro-Pro derivados de caseína son 5 μ M y 9 μ M, respectivamente. Sin embargo, la actividad inhibidora de ECA de estos péptidos es mucho más débil que la de la medicación con inhibidores de ECA (Mullally et al., 1996) y no siempre puede estar directamente relacionada con los efectos de reducción de la presión sanguínea *in vivo*. La relación entre los péptidos inhibidores de ECA y la actividad estructural no ha sido confirmada. Sin embargo, se han encontrado algunas características generales. Los péptidos inhibidores de ECA contienen habitualmente de 2 a 12 aminoácidos (Robert et al., 2004) y los aminoácidos hidrófobos en la posición C-terminal, como en la prolina, podrían ser los que tienen más probabilidades de tener propiedades inhibitoras (Ondetti y Cushman 1984).

2.3 Alimentos funcionales

Los alimentos funcionales son ampliamente reconocidos como "productos alimenticios y bebidas derivados de sustancias naturales o bien similares a los alimentos convencionales o que abarcan productos potencialmente útiles, incluidos cualquier alimento e ingrediente alimentario modificado, que pueden y deben ser consumidos como parte de la dieta diaria y se ha demostrado poseen algún beneficio fisiológico particular cuando se ingieren o reducen el riesgo de padecer o controlar alguna enfermedad crónica más allá de sus funciones nutricionales "(Roberfroid, 1999).

Se puede decir que un alimento es funcional si cumple uno de los siguientes criterios: a) Incluye un componente alimenticio (que sea o no nutriente) que tiene

efectos positivos sobre una o un limitado número de funciones en el cuerpo y b) tiene implicaciones fisiológicas o psicológicas como resultado del efecto nutricional tradicional (Roberfroid, 1999)

Colectivamente los alimentos funcionales deben tener un impacto positivo en el bienestar y la salud, tratando de llevar a reducir el riesgo de muchas enfermedades. Las sustancias activas biológicas en los alimentos funcionales pueden ser un macronutriente esencial si tienen efectos fisiológicos específicos o un micronutriente esencial si su consumo es superior a las recomendaciones diarias (Parvez et al., 2006).

Los alimentos funcionales también son bien conocidos como alimentos medicinales o terapéuticos (Shah, 2001). Los productos lácteos, pueden llegar a ser funcionales si se modifican de una manera particular como cuando se les adiciona alguna Bacteria Acido Láctica (BAL) (Shah, 2007).

La degradación de las proteínas de la leche durante la fermentación es un medio potencial para mejorar su valor nutricional tanto para los seres humanos como para los animales (Kilpi et al., 2007). Recientemente se ha prestado una gran atención a la hidrólisis de proteínas de la leche como ingredientes potenciales para los alimentos funcionales que promueven la salud, dirigidos a enfermedades crónicas relacionadas con la dieta, como las enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus tipo II (Mensink, 2006; Korhonen, 2009) y la obesidad (Korhonen, 2009; Tudor et al., 2009).

En estudios de investigación se ha informado que una dieta rica en derivados lácteos fermentados puede inhibir la proliferación de muchas células cancerígenas (Rachid, 2006). El mismo autor también señaló que estudios epidemiológicos en ratones han sugerido que la ingesta oral de productos lácteos fermentados con lactobacilos podría minimizar la incidencia de cáncer de colon. Del mismo modo, en otro estudio se informó que el consumo de productos lácteos fermentados

desnatados como el yogurt se asocia a la reducción del desarrollo de diabetes tipo II (Mensink, 2006).

Se ha señalado que existe una relación entre el consumo de productos lácteos bajos en grasa y la posibilidad de reducir el síndrome de sobrepeso y que la administración oral de leche y productos lácteos disminuyen la hipertensión; estos efectos benéficos para la salud están asociados a los compuestos biológicos derivados de la hidrólisis de proteínas de la leche, conocidos como péptidos bioactivos los cuales tienen actividad biológica (*in vitro* e *in vivo*) que afectan los sistemas digestivo, endocrino, cardiovascular, inmunológico y nervioso (Korhonen, 2009)

2.4 Fuentes de péptidos bioactivos

Además de las proteínas de la leche; se han identificado otras fuentes de péptidos bioactivos entre las que se encuentran algunas plantas que incluyen el trigo, el maíz, la soya, el arroz, la calabaza y el sorgo, así como la carne roja, el pescado y el huevo (Möller et al., 2008).

La leche contiene elementos nutritivos entre los que se encuentra la lactosa, grasas y proteínas. Los componentes más importantes de la leche, para la industria alimentaria, son las proteínas debido a sus propiedades nutricionales, fisiológicas y funcionales. Estas propiedades incluyen:

- Alta estabilidad térmica ya que el tratamiento térmico permite esterilizar los productos lácteos sin grandes cambios en la propiedad física de la leche.
- Coagulación con Ca^{2+} después de una proteólisis limitada inducida por el cuajo, que es explotada en la fabricación de una amplia gama de quesos y algunas proteínas funcionales.

- Coagulación en su punto isoeléctrico (pH 4.6), que se utiliza en la fabricación de muchos tipos de productos lácteos fermentados (Fox, 2001).

2.5 Leche de cabra

La leche es un producto secretado por las hembras mamíferas para la alimentación de sus crías a partir del nacimiento y durante las primeras etapas de su crecimiento (Villegas de Gante, 2004). La composición de la leche varía de acuerdo a la especie animal, el tipo de alimento que consume y el medio ambiente donde se desarrolla. La composición de la leche se modifica constantemente y su producción se ha intensificado, pero esto también está relacionado con los criterios de calidad del pago de la leche (Pirisi et al., 2007).

2.5.1 Proteínas de la leche de cabra

Los productos lácteos son una fuente confiable de proteínas de alta calidad que están bien equilibradas en aminoácidos. La variación del contenido de proteínas en la leche caprina, depende del polimorfismo genético de la α S1 caseína (Grosclaude y Martin, 1997). En general, la leche de cabra contiene menos α S1 caseína que la leche de otros rumiantes. Dependiendo de la frecuencia de alelos existente para la α S1 caseína en cada raza la proteína total puede depender indirectamente de la raza (Grosclaude y Martin, 1997). El contenido total de proteína puede variar de 22 a 41 g/L para leche de cabra, los principales factores no individuales de la variación del contenido de proteínas son la etapa de lactancia, la estación, la edad y la alimentación.

La especificidad de las proteínas de la leche en pequeños rumiantes también se basa en la mineralización y organización de micelas de caseína, las micelas de leche de cabra y oveja están altamente mineralizadas y el tamaño de micela caprina es significativamente mayor que la leche bovina u ovina (Remeuf et al., 1991; Pellegrini et al., 1994). Además la micela también contiene enzimas tales

como lipasa y plasmina, además de citrato, iones secundarios y suero de leche atrapado.

Las proteínas de la leche se producen en dos fases distintas: La fase micelar inestable compuesta de caseínas como micelas suspendidas, con un promedio de aproximadamente 190 nm de diámetro, están interrelacionados por fosfato de calcio y pequeñas cantidades de magnesio, sodio, potasio y citrato que difunden la luz y le dan a la leche su aspecto blanco opaco, y la fase soluble compuesta de proteínas de suero de leche. Las caseínas precipitan a un pH de 4.6 a temperatura ambiente, mientras que las proteínas de lactosuero (β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina y la seroalbúmina) en las mismas condiciones permanecen solubles (Juárez y Ramos, 1986) (Haenlein, 2004; Park, 2006).

2.5.2 Caseínas en leche de cabra

Aproximadamente el 80% de las proteínas totales de la leche de bovino, ovino y caprino son caseínas. Las principales fracciones de caseína son α 1 y α 2-caseínas (CN), β -CN y κ -CN (Swaisgood, 1992, Fox et al., 2000, Martin et al., 2003).

La composición de la caseína en la leche de cabra, oveja y vaca está determinada por polimorfismos genéticos en los loci α 1, α 2, β y κ - caseína. El polimorfismo de α 1-CN es uno de los más extensamente estudiados en la leche de cabra y vaca (Grosclaude et al., 1987).

Los tipos de mutaciones pertinentes son sustituciones, deleciones o inserciones grandes de nucleótidos únicos. Ocho de los alelos actualmente identificados en leche de cabra (A, B1, B2, B3, B4, C, H y L) están asociados con un alto nivel de α 1-CN (3.5 g / l de leche), dos (E e I) con niveles medios (1.1-1.7 g / l) y dos (F y G) con niveles bajos (0.45 g / l). El O1 y el O2 son alelos "nulos" y no producen α 1-CN en la leche de cabra (Chianese et al., 1997; Grosclaude y Martín, 1997).

La leche de cabra puede tener α_2 -CN, para lo cual se han identificado siete alelos, y que también están asociados con tres niveles diferentes de síntesis de caseína. Los alelos A, B, C, E y F producen contenidos "normales" de α_2 -CN (2.5 g / l), el alelo D causa contenidos reducidos de α_2 -CN, y el alelo O no tiene cantidades detectables de esta caseína en la leche de cabra.

Existen dos tipos diferentes de caseína submicelar; con y sin κ -caseína, la agregación de las submicelas ocurre a través de puentes de fosfato de calcio, interacción hidrofóbica y enlaces de hidrógeno. El núcleo hidrofóbico de las submicelas está compuesto por las caseínas sensibles al calcio y el extremo N de κ -CN, el extremo C-terminal hidrófilo de κ -CN sobresale de la superficie de la micela, formando una capa vellosa que evita una mayor agregación de las submicelas (Walstra, 1999)

2.5.3 Proteínas del lactosuero

El suero lácteo o lactosuero se puede definir como el subproducto originado tras la separación de la cuajada en la elaboración de queso o durante la separación de las caseínas de la leche para producir caseinatos (Pintado et al., 2001; Foegeding et al., 2002).

En función de la forma de producir la separación de la caseína de la leche se pueden producir 2 tipos de lactosuero: el suero ácido que procede de la fabricación de quesos frescos de coagulación ácida como el cottage o el quark, que son elaborados mediante fermentación microbiana; o se puede producir de la obtención industrial de caseínas y caseinatos a través de la acidificación directa de la leche mediante la adición de acidulantes como la glucono- δ -lactona o ácidos minerales u orgánicos (Jelen, 1992; 2003). El suero dulce se obtiene de la coagulación enzimática de las caseínas durante la fabricación de la mayoría de los quesos como el Cheddar, Swiss, Gouda, Mozzarella, etcétera (Jelen, 1992). Este tipo de suero es el más abundante y generalmente posee un mayor pH ($\geq 5,6$) y

un mayor contenido en lactosa, mientras que el suero ácido, con un pH (≤ 5.1) presenta un menor contenido en lactosa, porque ésta se convierte en ácido láctico pero posee una mayor concentración de minerales.

Los principales componentes de los lactosueros, son agua (93-94%), lactosa (70-75% de los sólidos totales), proteínas séricas (8-11% de los sólidos totales) y minerales (10-15% de los sólidos totales) (Jelen, 1992; 2003). También presenta grasa y vitaminas (Smithers, 2008). Las proteínas del suero se componen de cuatro tipos principales de proteínas, β -lactoglobulina (β -Lg, 50%), lactoalbúmina (α -La, 20%), albúmina de suero sanguíneo (10%), lactoferrina e inmunoglobulinas (Ig, 10%, principalmente IgG1, con cantidades menores de IgG2, IgA e IgM) (Ha y Zemel, 2003).

Las proteínas de suero lácteo poseen estructuras secundarias, terciarias y en la mayoría de los casos, cuaternarias en niveles altos. β -lactoglobulina, sufre una limitada autoasociación a los valores de pH normales de la leche, para formar un dímero; estos dímeros se disocian en solución a 60°C, volviéndose susceptibles a la desnaturalización por desdoblamiento de la estructura terciaria. Se ha informado que las proteínas del suero son proteínas globulares típicas y desnaturalizan por calentamiento a 90 °C durante 10 min (Fox, 2001). Las proteínas del suero no están fosforiladas y son insensibles al Ca^{2+} además tienen un papel biológico importante como el transporte de iones de calcio, zinc, cobre, hierro y fosfato en el organismo (Fox, 2001; Korhonen et al., 1998).

2.6 Bacterias ácido lácticas.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos Gram-positivos no esporulados microaerofilicos. Producen ácido láctico como producto de la fermentación de carbohidratos. Durante la fermentación se producen cambios organolépticos en el alimento; los cuales pueden hacer más agradable su sabor (Kandler, 1983).

Bajo la definición de bacterias lácticas se encuentran tanto cocos (*Lactococcus*, *Vagocococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*) como bacilos (*Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Bifidobacterium*) los cuales son los más utilizados en fermentaciones alimentarias, encontrándose en productos lácteos, cárnicos, vegetales, frutas y bebidas, así como en el tracto gastrointestinal y genital del hombre y otros animales (Collins et al., 1991).

2.6.1 Género *Lactobacillus*.

Dentro de las bacterias lácticas el género *Lactobacillus* es el que presenta mayor número de especies (más de 100). Fue propuesto por Beijerinck en 1901 y es un grupo muy heterogéneo. Basándose en la secuencia de ARN ribosomal 16S se propone la clasificación de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* en tres grupos (Collins et al., 1991)

- Grupo I o de *L. delbrueckii* (a). Incluye *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. helveticus* y otras especies de lactobacilos homofermentativos estrictos y tres especies heterofermentativas facultativas: *L. acetotolerans*, *L. hamsteri* y *L. intestinalis*.
- Grupo II o de *L. casei* – *Pediococcus* (b). Es el grupo más grande, con numerosas especies de lactobacilos y de pediococos. Comprende homofermentativos estrictos (*L. aviarius*, *L. salivarius*), heterofermentativos facultativos (*L. agilis*, *L. bifementans*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. sakei*) y heterofermentativos estrictos (*L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*).
- Grupo III o de *Leuconostoc* (c). Contiene todos los miembros del género *Leuconostoc* y algunos *Lactobacillus* heterofermentativos estrictos.

Se realizó una reorganización de las especies en tres grupos: A, B y C, basándose en caracteres moleculares (Kandler & Weiss, 1986). Con esta nueva clasificación las especies se agruparon en relación a sus características fenotípicas (letras

mayúsculas) y la adscripción a cada uno de los tres grupos filogenéticos se indica con letras minúsculas (a, grupo I; b, grupo II; c, grupo III). Como ejemplo, *L. casei* es Bb. Y *L. helveticus* es Aa

- Grupo A. Homofermentativos estrictos. Incluye los lactobacilos del grupo I y algunas especies de otros géneros que son homofermentativos obligados, significando que solo pueden fermentar los azúcares mediante la vía de la glucólisis. Poseen la enzima fructosa-1,6-P aldolasa, pero carecen de la fosfoacetolasa, por lo que no fermentan ni el gluconato ni las pentosas. El balance global de la vía homoláctica es la producción de dos moles de lactato y un rendimiento energético de dos moles de ATP por mol de glucosa fermentada (Brock & Madigan, 1991; Nelson & Cox, 2001).
- Grupo B. Heterofermentativos facultativos. Formado por lactobacilos del grupo II y la mayoría de especies de enterococos, lactococos, pediococos, estreptococos, tetrigenococos y vagococos. Presentan una situación metabólica intermedia, poseen tanto fructosa-1,6-P aldolasa como fosfoacetolasa y normalmente se comportan como homofermentativos frente a las hexosas y heterofermentativos con las pentosas. El balance global de la fermentación de un mol de glucosa por la vía heterofermentativa es un mol de lactato, uno de etanol y uno de CO₂ y un rendimiento energético de un mol de ATP (Gottschalk, 1986).
- Grupo C. Heterofermentativos estrictos. Integrado por leuconostoc, lactobacilos del grupo III, oenococos y weissellas que son heterofermentativos estrictos. Solo pueden utilizar la ruta de las pentosas fosfato para la fermentación de azúcares debido a la carencia de fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa y gracias a la presencia de la fosfoacetolasa. La fermentación heteroláctica de pentosas produce un mol de lactato y un mol de acetato por mol de pentosa fermentada y el rendimiento energético de dos moles de ATP (Kandler, 1983).

2.6.2 Metabolismo microbiano de la lactosa

Se han establecido dos sistemas para el transporte de lactosa y el metabolismo para las bacterias ácido lácticas: (i) un sistema fosfoenolpiruvato-lactosa fosfotransferasa (PEP-PTS) con una enzima fosfo- β -galactosidasa, que se encuentra en los lactococos y *L. casei*, y (ii) un sistema de lactosa permeasa con una β -galactosidasa, que se encuentra en los termófilos *L. bulgaricus*, *L. helveticus* y *S. thermophilus* y el *Leuconostoc lactis* mesófilo (Vaughan et al., 1996).

La lactosa se introduce a la célula ya sea a través del PEP-PTS o mediante sistemas de lactosa permeasa. Durante el transporte en la membrana celular, la lactosa translocada a través del sistema PEP-PTS se fosforila, y cuando está dentro de la célula, se escinde mediante fosfo- β -galactosidasa. La glucosa formada se metaboliza por enzimas a través de la ruta glucolítica, mientras que la galactosa resultante se convierte en tagatosa y se divide en triosa, entrando en la ruta glicolítica (Cocaign Bousquet et al., 1996)

2.6.3 Actividad proteolítica de las Bacterias Ácido Lácticas

Las bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos fermentados necesitan de 4 a 14 aminoácidos para crecer según la cepa (Chopin, 1993). Se ha confirmado que la cantidad de aminoácidos libres y péptidos cortos en la leche es muy baja, por lo tanto las BAL desarrollaron un sistema proteolítico que les permite la degradación de las proteínas de la leche para su crecimiento (Savijoki et al., 2006). Las caseínas están compuestas por todos los aminoácidos necesarios para el crecimiento de las BAL en la leche a una alta densidad celular (Kunji et al., 1996).

Las proteínas de la leche durante la fermentación se someten a una ligera degradación proteolítica que da como resultado una serie de péptidos potencialmente bioactivos que pueden variar entre 2-20 residuos de aminoácidos.

Se sabe que muchos de ellos expresan propiedades fisiológicas multifuncionales, (FitzGerald y Meisel, 2003). La proteólisis es un proceso en cascada que implica una serie de etapas que incluyen:

- a) Una proteinasa extracelular que inicia la degradación de caseína en oligopéptidos.
- b) Sistemas de transporte que translocan péptidos y aminoácidos a través de la pared celular.
- c) Diversas peptidasas intracelulares para una mayor degradación de péptidos en aminoácidos (Kunji et al., 1996).

3. Justificación

Se sabe que los tratamientos de la hipertensión son costosos, y muchos de estos implican efectos secundarios indeseables para los pacientes, por lo que se busca obtener alimentos que mejoren la calidad de vida de los pacientes reduciendo los efectos indeseables.

En nuestro país se han realizado pocos experimentos enfocados en los péptidos lácteos bioactivos y entre estos la mayoría han sido llevados a cabo con productos lácteos de origen bovino; los cuales han mostrado actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina; por lo que se planteó determinar el porcentaje de inhibición de la ECA con fermentados lácteos (leche y lactosuero) de origen caprino con las cepas de *L. helveticus* y *L. casei in vitro*. Esto también es con el fin de darle un valor agregado a la leche y productos lácteos de origen caprino que son poco consumidos y escasos en nuestro país.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general.

Determinar *in vitro* el porcentaje de inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina en fermentados de leche y lactosuero caprino obtenidos con dos diferentes cepas de lactobacilos.

4.2 Objetivos particulares.

- Determinar el porcentaje de inhibición de la Enzima convertidora de angiotensina en fermentados de leche y lactosuero caprino obtenidos con la bacteria *Lactobacillus helveticus in vitro*.
- Determinar el porcentaje de inhibición de la Enzima convertidora de angiotensina en fermentados de leche y lactosuero caprino obtenidos con la bacteria *Lactobacillus casei in vitro*.
- Comparar y determinar que bacteria tiene mayor capacidad de inhibir a la enzima convertidora de angiotensina *in vitro*.
- Observar el comportamiento del pH en los diferentes tiempos de los fermentados.

5. Hipótesis

- Los fermentados de leche y lactosuero caprinos inoculados con *L. helveticus* y *L. casei* inhiben la actividad de ECA.

6. Material y métodos

El material utilizado para la inoculación de los lactobacilos fue esterilizado con calor húmedo y presión en una autoclave (Felisa FE-399) a 120 °C por 15 minutos en las instalaciones del Laboratorio de Toxicología del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la FMVZ UNAM. Se formaron 4 grupos; leche caprina fermentada con *L. helveticus*, lactosuero caprino fermentado con *L. helveticus*, leche caprina fermentada con *L. casei*, lactosuero caprino fermentado con *L. casei*, se tomaron muestras de cada grupo a las 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas post inoculación.

6.1 Leche y lactosuero

Tanto la leche como el lactosuero utilizados en este experimento fueron proporcionados por el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA, Topilejo, Tlalpan, Ciudad de México). La leche proviene de la primera ordeña por la mañana de cabras de razas Alpina Francesa, Saanen, Anglo Nubia, Toggenburg y sus cruces mezclada en un tanque colector que se encuentra en la quesería. El lactosuero se obtuvo a partir de la realización de queso panela que se produce en las mismas instalaciones para venta, se procedió a transportar los productos lácteos en recipientes de poliestireno para mantener la cadena fría (5 °C) hasta llegar al Laboratorio de Toxicología.

La leche y el lactosuero de cabra antes de ser inoculado con el lactobacilo fueron descremados (VIGUSA® Elecrem Modelo ELE-1) y posteriormente la leche y el lactosuero obtenido fueron sometidos a una pasteurización lenta 65°C por 30 minutos para eliminar las bacterias presentes en la leche que pudieran interferir con el desarrollo del experimento.

6.2 Microorganismos

La bacteria *Lactobacillus helveticus* (ATCC® 15009) fue obtenida de los laboratorios a ATCC, *Lactobacillus casei* donada por el Cepario de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

6.2.1 Propagación de *L. helveticus*

La propagación, preparación de inóculo y posterior fermentación de la leche se llevó a cabo en las instalaciones del Cepario de la Facultad de Química, UNAM.

A partir de un único tubo de caldo Mann Rogosa y Sharpe (MRS) (6 ml), se retiró 1 ml que se utilizó para rehidratar el pellet. Posteriormente se transfirió asépticamente el pellet rehidratado en el tubo de caldo MRS y se mezcló vigorosamente.

Se usó 1 ml de esta suspensión para inocular un segundo tubo de caldo con una inclinación, así como una placa de Petri para realizar la posterior identificación del bacilo. Se incubaron los tubos a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 24 horas.

Después de 24 horas, el crecimiento fue evidente por la turbidez en el caldo y la formación de pequeñas colonias en la placa de Petri.

6.2.2 Preparación del Pre-inóculo

Los organismos fueron almacenados a -80 °C. La propagación para cada cepa se realizó de acuerdo a Donkor et al (2007b).

En alícuotas estériles de 10 ml de caldo de cultivo Mann Rogosa Sharpe (MRS) fueron inoculados con 1% (equivalente a 100 µl) de la cepa a utilizar y se incubaron a 37 ° C durante 24 h. Después de dos transferencias sucesivas de 24 h de incubaciones, los organismos activados fueron usados para la preparación del

pre-inoculo. El pre-inoculo fue preparado mediante la transferencia de 1% (v / v) del cultivo activado a alícuotas de 10 ml de leche descremada estéril reconstituida (RSM) conteniendo 14% (peso/peso) total de solidos de leche.

En relación con *L. casei*, el Cepario de la FQ cuenta con pre inóculos activados en tubos de agar APT semisólido la cual fue tomada de estos para la inoculación y posterior fermentación de los sustratos.

6.3 Fermentación del sustrato

Las colonias activadas de lactobacilos en la forma de pre-inóculos fueron usadas para la fermentación de los sustratos. Cada organismo fue transferido a la leche o lactosuero estéril para obtener 10^8 UFC/ml. La leche y el lactosuero fueron colocados en tubos de ensayo (10 ml) y se les inoculo 1 ml del lactobacilo (relación 10:1) cuatro muestras por cada tiempo y diferente sustrato, las cuales fueron colocadas en una incubadora hasta el momento de su posterior manejo.

En el caso de *L. helveticus* las condiciones de incubación fueron 37°C y una atmosfera con 5 % de CO₂ y para *L. casei* fueron 37°C en aerobiosis. Se tomaron muestras para análisis a intervalos de 12 horas: 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas durante el tiempo de fermentación para la leche y lactosuero de *L. helveticus* y leche y lactosuero de *L. casei*. El cambio de pH fue medido mediante un potenciómetro a los tiempos indicados.

6.4 Preparación de las muestras

Las muestras fueron trabajadas en el Laboratorio de Toxicología del DNAB en la FMVZ UNAM. Los fermentados fueron centrifugados a 3500 revoluciones por minuto (rpm) por 15 min a 4 °C (Thermo Scientific ® Sorvall Primo R) y el sobrenadante fue separado por un Acrodisco de 0.45 µm (Millex® HN) y colocados en tubos eppendorf ® de 2 ml y almacenado a -40 °C para su siguiente análisis.

Se procedió a preparar la solución de sustrato buferada (6.7 mM de Hip- His-Leu (Sigma® H1635) en 50 mM HEPES (Sigma® H7006) con 300 mM NaCl estabilizando el pH en 8.3 a 37°C.

6.5 Medición de la Actividad Inhibitoria de la ECA

La actividad inhibitoria de la ECA se midió por una versión modificada del método de Cushman y Cheung (1971). Alícuotas (200µl) de la solución sustrato buferada (6.7 mM de Hip- His-Leu en 50 mM HEPES con 300 mM NaCl a un pH de 8.3 a 37°C) fue mezclado con 50 µl de la fracción de lactosuero aislada de cada leche y pre incubada a 37°C por 5 min. 30 µl (0.33 U/ml) de la ECA (Sigma® A66778) fue adicionada para comenzar la reacción enzimática. Después de 20 minutos de incubación a 37 °C la reacción enzimática fue detenida por la adición de 300 µl de HCl 1N. El ácido hipúrico liberado por la acción de la ECA fue extraído con 2.4 ml de acetato de etilo de los cuales 1 ml fue evaporado. El sedimento fue disuelto en 2.5 ml de agua desionizada y la absorbancia fue determinada mediante espectrofotometría a 228 nm (Leclerc et al., 2002).

6.6 Cálculo del porcentaje de Actividad Inhibitoria de la ECA

La actividad de inhibición se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad inhibitoria (\%)} = 100 * (A-B) - [(C-D)/(A-B)]$$

Donde

A: absorbancia de una solución que contiene ECA sin la muestra de suero

B: absorbancia de una solución con ECA previamente inactivada mediante la adición de HCl y sin muestra de suero

C: absorbancia en presencia de ECA y muestra de suero

D: absorbancia con ECA previamente inactivado con HCl y que contiene la muestra de suero. (Leclerc et al., 2002).

Se realizaron cuatro repeticiones de cada ensayo.

6.7 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar. El diseño matemático del experimento es factorial 2 X 2 con mediciones repetidas en el tiempo. Las diferencias de cambios dentro y entre los grupos de tratamientos fue evaluado mediante ANOVA de tres vías con prueba de Bonferroni. Diferencia con $p < 0.05$. El programa usado para realizar el estadístico es Sigma plot 13.0.0/ 2014

7. Resultados

Todas las muestras de los fermentados fueron tomadas en tiempo y llevadas al Laboratorio de Toxicología de la FMVZ para su procesamiento.

7.1 Comportamiento de los fermentados

En la Figura 1 se puede observar una tendencia a incrementar el porcentaje de inhibición en los sustratos utilizados (leche y lactosuero) llegando a un punto de saturación entre las 24 y 36 horas de incubación, después de esta hora existe una tendencia lineal a disminuir la eficacia de estos sustratos ($p \leq 0.05$)

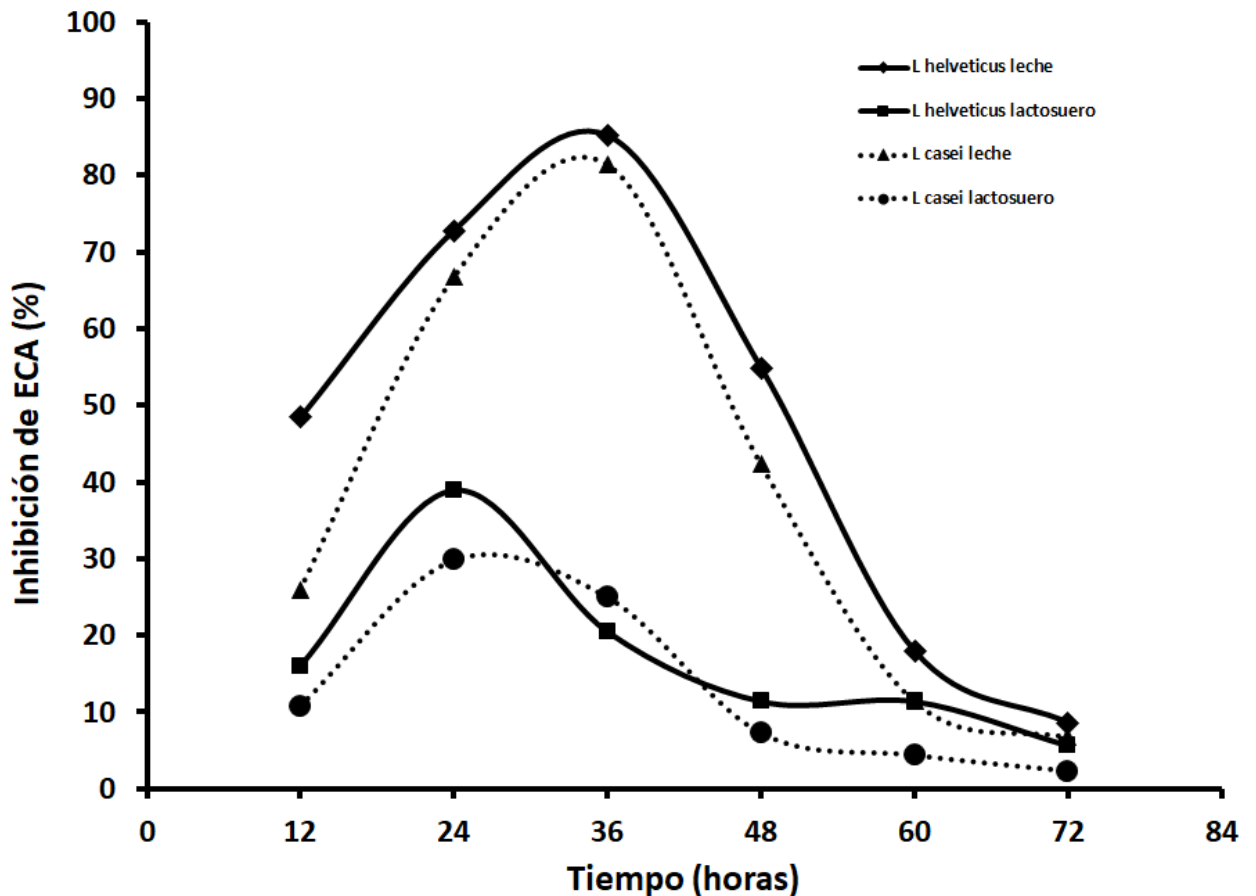


Figura 1. Comportamiento de la inhibición de la ECA de los diferentes fermentados lácteos respecto al tiempo (%).

7.2 Fermentados de leche

Los resultados del porcentaje de inhibición de los fermentados de leche caprina inoculados con *L. helveticus* y *L. casei* así como el pH en el tiempo transcurrido durante la fermentación se describen en Cuadro 1

Cuadro 1

Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) por los fermentados de leche caprina con *L. helveticus* y *L. casei* (%)

Tiempo/ Horas	<i>L. helveticus</i>			<i>L. casei</i>		
	\bar{X}	D.E	pH	\bar{X}	D.E	pH
12	48.42	0	4.5	25.97	0.16	6.1
24	72.80	0.48	4.0	66.74	0.48	5.7
36	85.20	0.80	3.9	81.48	0.64	5.6
48	54.90	0.80	3.9	42.36	0.00	5.4
60	17.98	0.16	3.7	11.37	0.48	5.0
72	8.61	0.48	3.6	6.69	1.11	5.0

La intensidad del porcentaje de inhibición por el fermentado de las proteínas de la leche se inició a las doce horas con $48.42 \pm 0\%$ (*L. helveticus*) y $25.97 \pm 0.16 \%$ (*L. casei*) observando una diferencia significativa (figura 2 $p < 0.05$) en este tiempo.

A las 24 horas post inoculación el porcentaje aumenta de manera significativa mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes lactobacilos. El porcentaje más alto se observó a las 36 horas con $85.2 \pm 0.80 \%$ y $81.48 \pm 0.64 \%$ para *L. helveticus* y *L. casei* respectivamente.

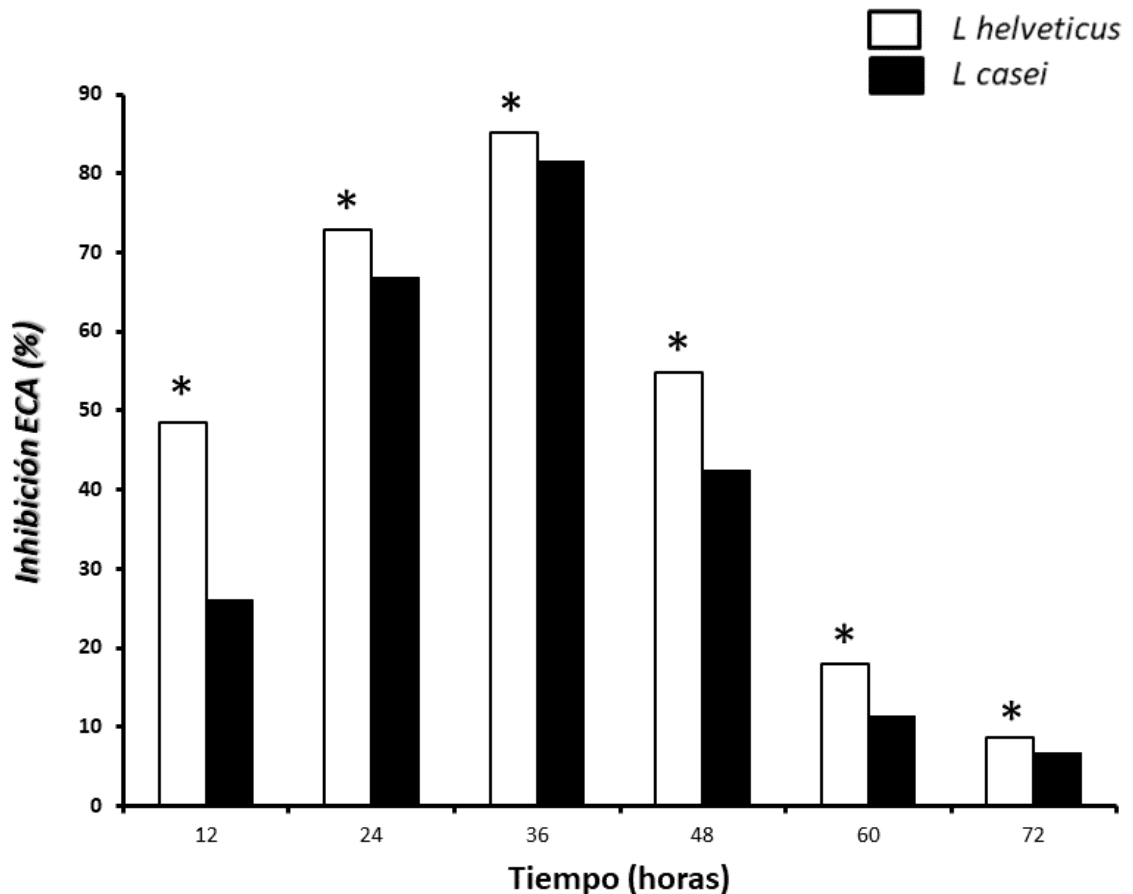


Figura 2. Inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) de los fermentados de leche (%). * $p < 0.05$

Cuando se analizan los resultados de la efectividad de los bacilos utilizados (*L. helveticus* y *L. casei*) respecto al sustrato leche encontramos que es más eficaz *L. helveticus* (en promedio 1.5 veces mayor) (Figura 2).

7.3 Fermentados de lactosuero

Los hallazgos en el Cuadro 2 corresponden a la intensidad del porcentaje de inhibición por el fermentado de las proteínas del lactosuero se inició a las doce horas con $16.05 \pm 0.16\%$ *L. helveticus* y $10.76 \pm 0.41\%$ *L. casei*. El porcentaje más alto se observó a las 24 horas con $38.92 \pm 0.48\%$ (*L. helveticus*) y $29.83 \pm 0.48\%$ (*L. casei*); al término del periodo de incubación (72 horas) se observó $5.6 \pm 0.32\%$ y $2.28 \pm 0.16\%$ de inhibición con *L. helveticus* y *L. casei* respectivamente.

Cuadro 2

Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) por los fermentados de lactosuero caprino con *L. helveticus* y *L. casei* (%).

Tiempo/ Horas	<i>L. helveticus</i>			<i>L. casei</i>		
	\bar{X}	D.E	pH	\bar{X}	D.E	pH
12	16.05	0.16	5.8	10.76	0.41	5.9
24	38.92	0.48	4.9	29.83	0.48	5.8
36	20.46	0.80	4.5	25.01	0.32	5.6
48	11.37	0.48	4.1	7.24	0.16	5.5
60	11.4	.016	4.0	4.34	0.32	5.3
72	5.6	0.32	3.8	2.28	0.16	5.1

Se puede observar diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los grupos de lactosuero fermentado con *L. helveticus* contra los fermentados con *L.*

casei, determinando que los fermentados con *L. helveticus* es 1.3 a 2.5 veces más eficaz que los de *L. casei* (figura 3 $p < 0.05$) exceptuando a las 36 horas post inoculación en donde *L. casei* es 1.22 veces más eficaz que *L. helveticus*. Observándose una mayor capacidad inhibitoria a las 24 horas en ambos fermentados.

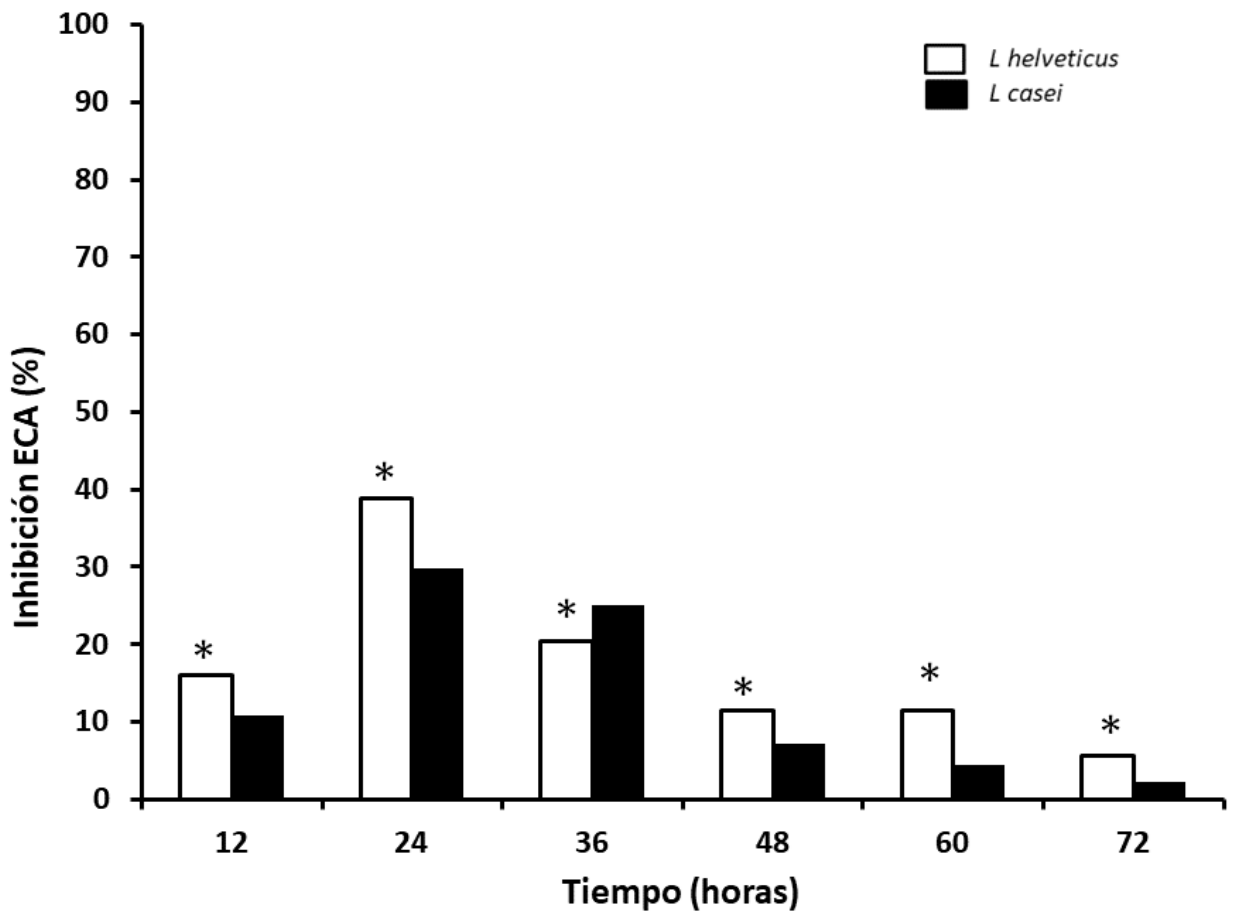


Figura 3. Inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) de los fermentados de lactosuero (%). * $p < 0.05$

7.4 *L. helveticus* en diferentes sustratos

Los resultados del estudio del porcentaje de inhibición de la actividad de la ECA en fermentado lácteo con *L. helveticus* indican que la efectividad del fermentado de leche es 3 veces más eficaz que el del lactosuero a las 12 horas post inoculación, 1.9 a las 24, 4.2 a las 36, 4.8 a las 48, 1.6 a las 60 y 1.5 a las 72 horas. Observándose el mayor porcentaje de inhibición (85.2%) a las 36 horas en el caso de los fermentados de leche y de 38.9 % (24 horas) en el caso de los fermentados de lactosuero (Figura 4). Existe diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) tiempo tratamiento.

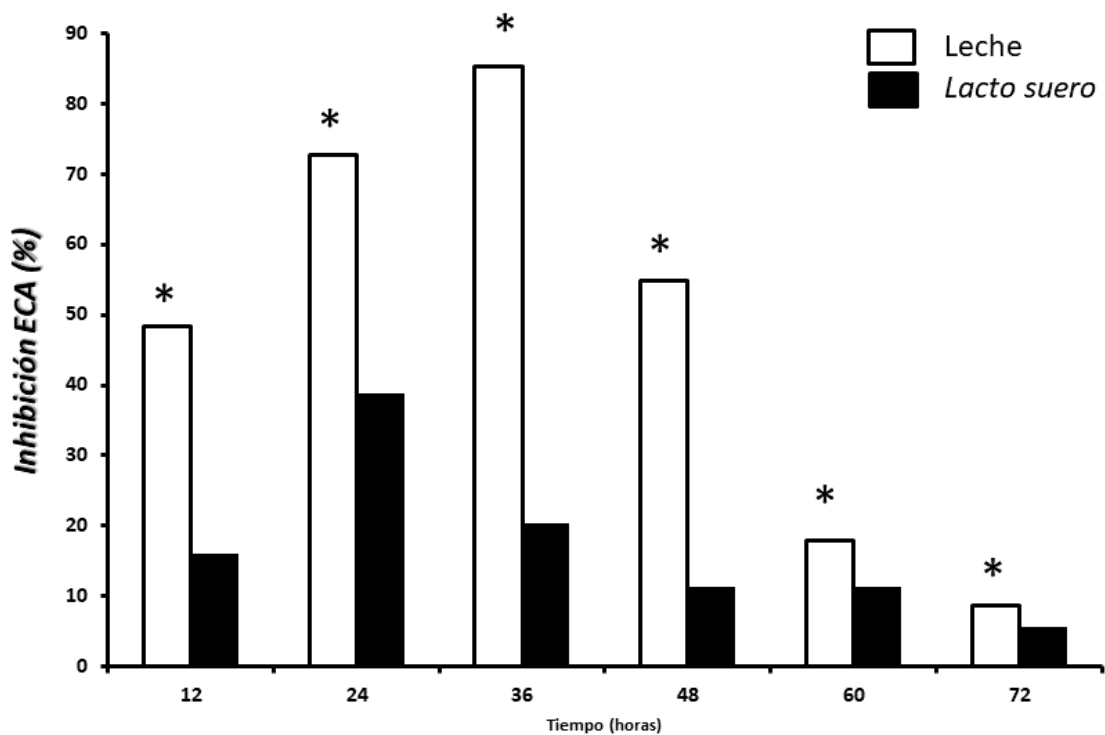


Figura 4. Inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) de los fermentados de leche y lacto-suero con el lactobacilo *L. helveticus* (%). * $p < 0.05$

7.5 *L. casei* en diferentes sustratos

Los resultados del estudio del porcentaje de inhibición de la actividad de la ECA en fermentado lácteo con *L. casei* indican que la efectividad del fermentado de leche es 2.4 veces (12 horas), 2.24 (24 horas), 3.26 (36 horas), 5.85 (48 horas), 2.62 (60 horas) y 2.93 (72 horas) mayor que el fermentado obtenido del lactosuero. Teniendo un mayor porcentaje de actividad a las 36 horas (81.5%) en el caso de fermentados de leche y de 29.8 % (24 horas) para el caso de fermentados obtenidos de lactosuero. Existiendo diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) tiempo tratamiento.

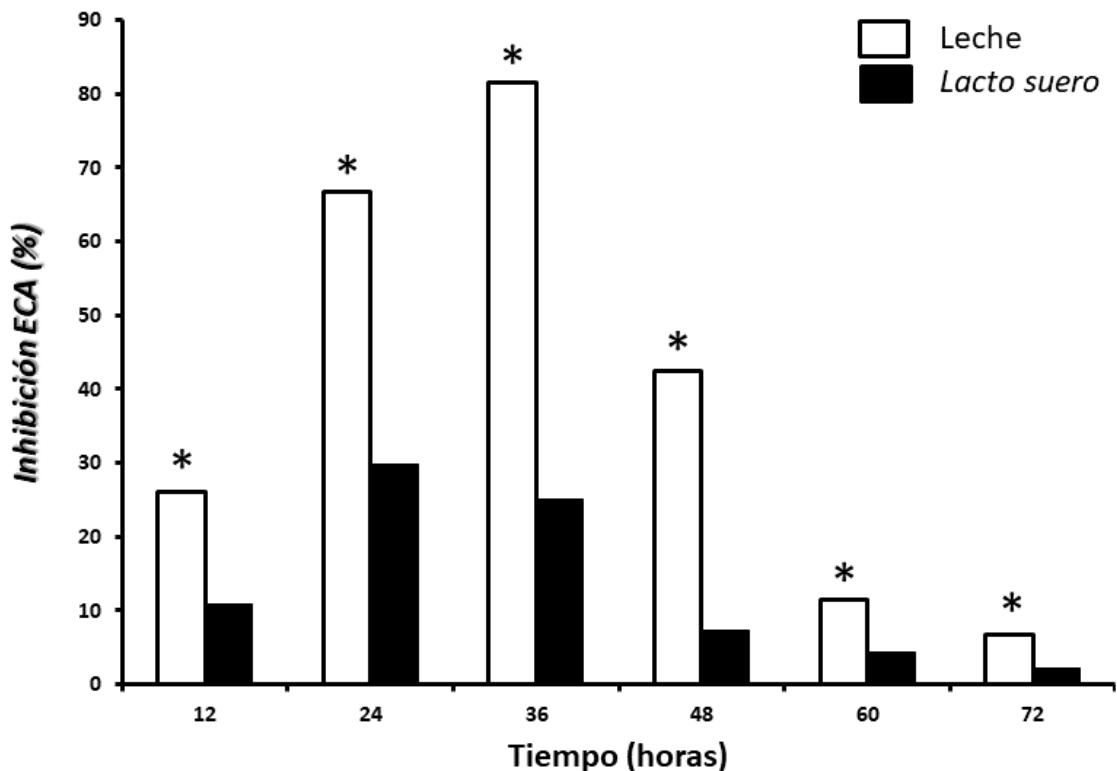


Figura 5. Inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) de los fermentados de leche y lacto-suero con el lactobacilo *L. casei* (%).

* $p < 0.05$

7.6 Análisis del pH con respecto al tiempo

En la Figura 6 se presenta el comportamiento del pH durante el transcurso de la investigación. Los resultados muestran que las concentraciones de pH más bajas fueron alcanzados por *L. helveticus* en la leche caprina; ya que al inicio la leche tiene un pH normal de 6.3 y a las 12 horas este había descendido de manera abrupta a 4.5, a las 24 horas post inoculación este disminuyó a un pH de 4 y continuo bajando para llegar a 3.6 a las 72 horas. En el caso de la leche fermentada con *L. casei* a las 12 horas presentaba un pH de 6.1 el cual disminuyó paulatinamente hasta las 60 horas donde el pH es de 5 y este se mantiene igual hasta el final de la investigación.

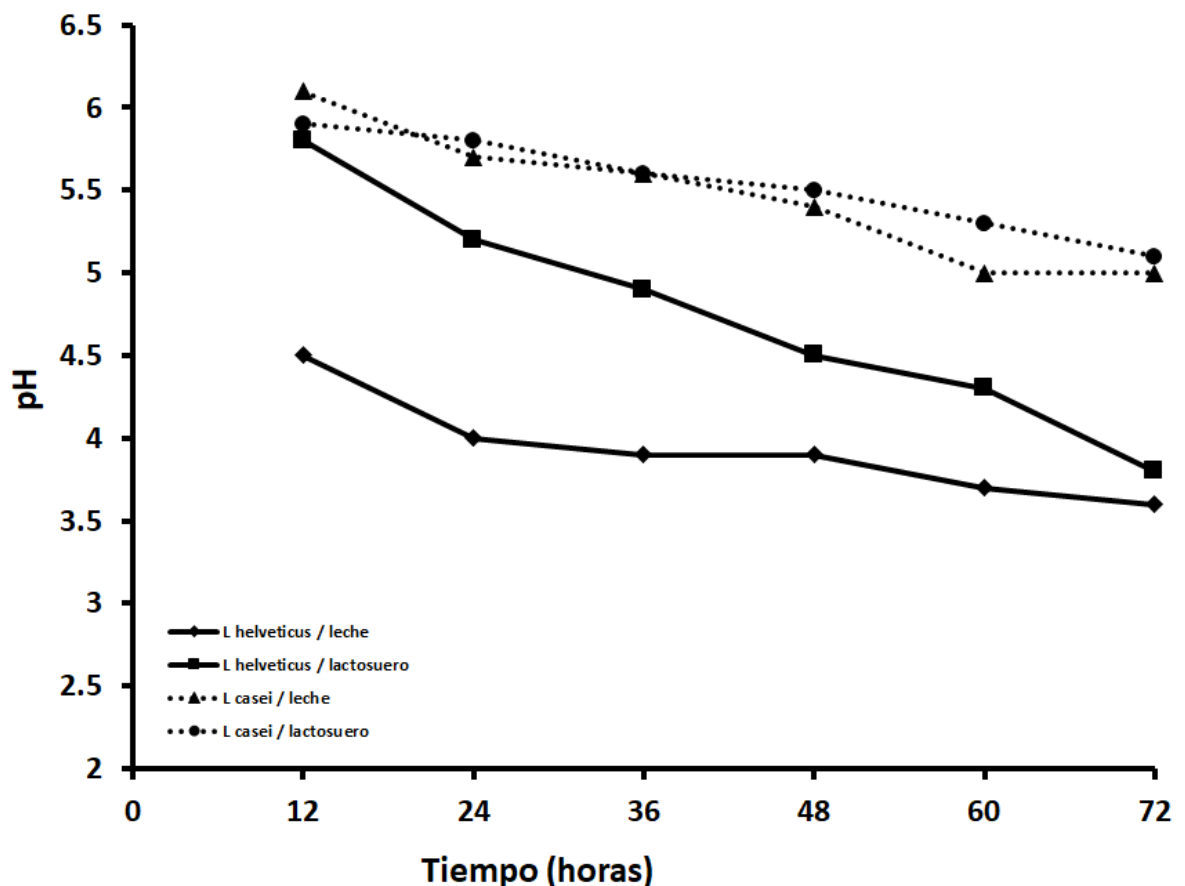


Figura 6. Comportamiento del pH de los diferentes fermentados respecto al tiempo.

En el caso del lactosuero con un pH 6.0 previo a la inoculación, este se comportó de manera similar entre ambos fermentados a las 12 horas teniendo solo una diferencia de 0.1, 5.8 para *L. helveticus* y de 5.9 para *L. casei*; a partir de las 24 horas las diferencia fue mayor presentando pH más bajos los fermentados con *L. helveticus* que se mantenían por debajo del pH 5.0 alcanzando el valor más bajo al final del trabajo con 4.3, de otra manera el *L. casei* a partir de las 24 horas tuvo un descenso más lento en los diferentes tiempos llegando a 5.1 al final del trabajo a las 72 horas post inoculación.

7.7 Relación pH porcentaje de inhibición

En la Figura 7 se puede observar que hay una relación entre el porcentaje de inhibición de la ECA con el pH de los sustratos habiendo una mayor efectividad en pH ácidos, posiblemente debido a la mayor degradación de las proteínas. También se puede observar que el sustrato leche con *L. helveticus* genera fermentados ácidos (pH entre 4.5 a 3.6) que inhiben eficientemente la actividad de ECA, mientras que en el sustrato leche inoculada con *L. casei* se generan concentraciones menos ácidas (entre 5.9 y 5) con una alta eficacia en el porcentaje de inhibición de ECA. El pH generado en lactosuero tanto de *L. helveticus* y *L. casei* se encuentra en un rango que va de 6.1 a 4.3, con un bajo porcentaje de inhibición de ECA.

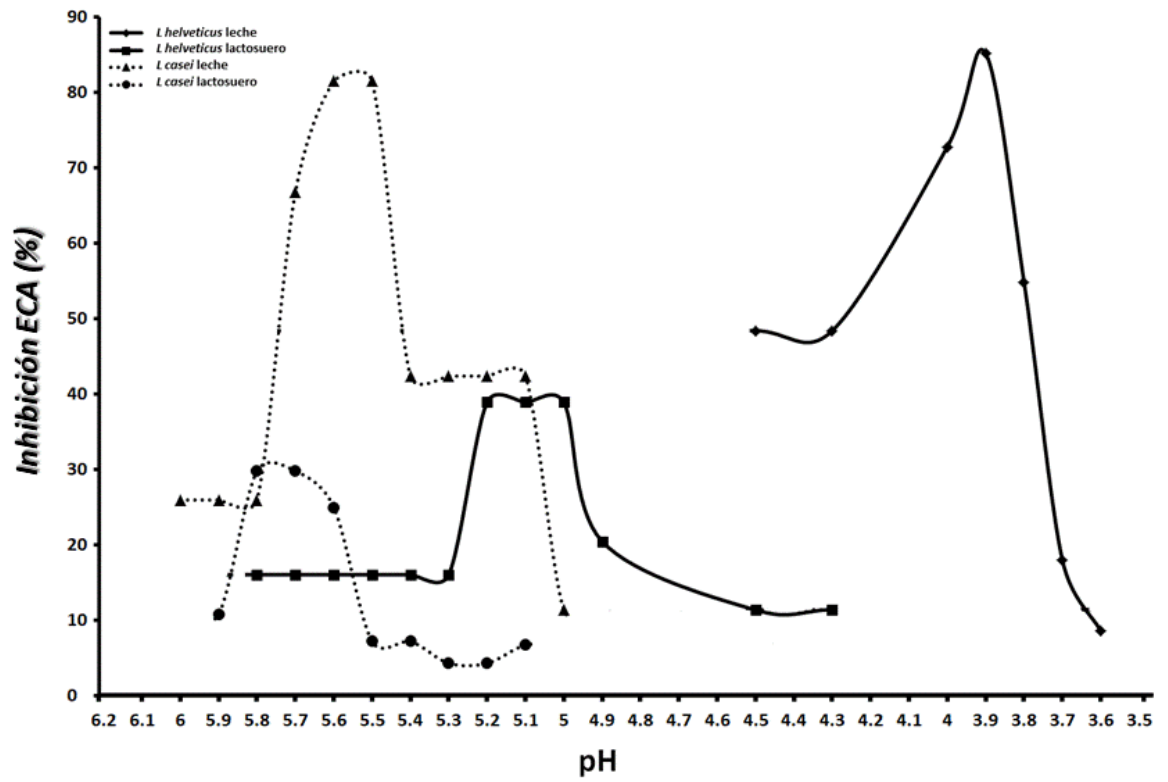


Figura 7. Relación del pH de los diferentes fermentados con respecto al porcentaje de inhibición.

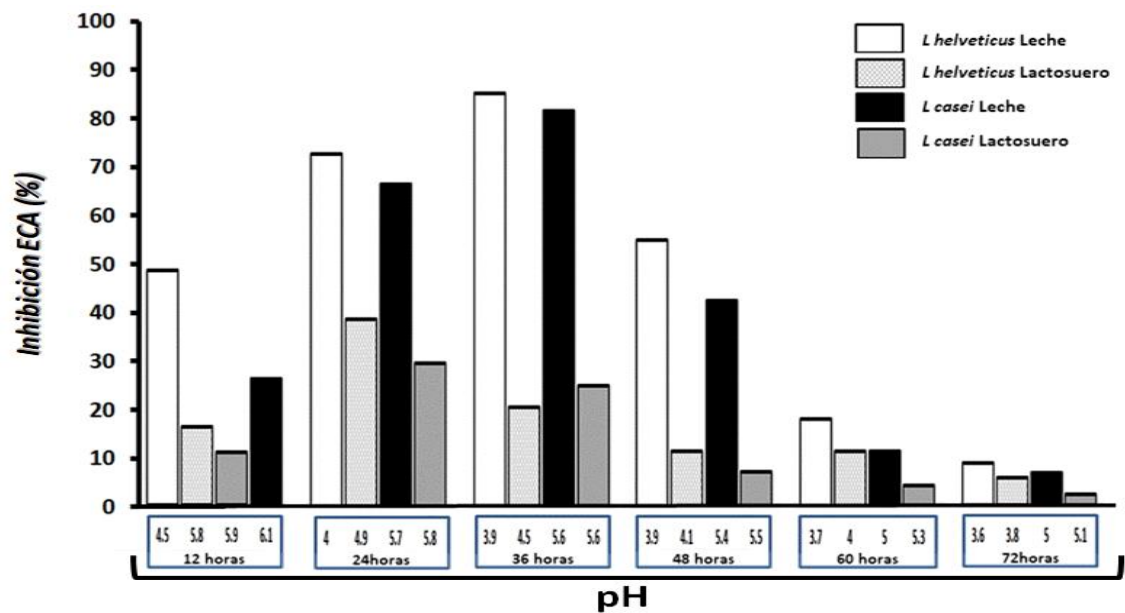


Figura 8. Efecto de la cepa y el tiempo de incubación en el porcentaje de inhibición de la ECA.

Los resultados observados del porcentaje de inhibición de la ECA de acuerdo al pH de los fermentados indican que existe una mayor eficacia en aquellos donde el pH es más ácido existiendo una asociación de pH tiempo esto es a mayor tiempo menor pH (Figura 6) y mayor porcentaje de inhibición (Figura 8)

8. Discusión

La leche y sus subproductos tienen múltiples virtudes dietéticas, así como algunos beneficios que ayudan a controlar ciertos padecimientos, mientras que los lactobacilos son muy utilizados en la producción de nuevos productos al cambiar las cualidades organolépticas originales muchas veces mejorando o intensificando sabores y olores.

8.1 Porcentaje de Inhibición de la ECA

Al analizar los resultados obtenidos del porcentaje de inhibición de la actividad de ECA desafiada con los fermentados de leche y lactosuero inoculados con *L. helveticus* y *L. casei* encontramos evidencia suficiente para asegurar que el mejor fermentado en la inhibición de la actividad de la ECA es el derivado de leche, ya que este incrementa más de 2.5 veces su eficacia (Figura 2) comparado con los fermentados obtenidos de lactosuero, llegando a porcentajes de inhibición de hasta el 80% entre las 24 y 36 horas. Estos resultados también han sido reportados por (Donkor, 2007b), quien encontró que los inóculos de *L. helveticus* tienen una eficacia de inhibición de hasta 41.15% (24 horas) en leche bovina. Por otro lado Rojas R (2009) reporta resultados que apoyan que los lactosueros son menos eficaces en la inhibición de la ECA reportando valores de 51% (15 horas), 45 % (21 horas) y del 23% (36 horas) en lactosuero bovino. Estos resultados se deben probablemente a la mayor concentración de proteína en leche ya que la actividad inhibitoria de los fermentados sobre la actividad de la ECA está asociada a la hidrólisis de la proteína, contenida en el sustrato, realizada por bacilos con los que se inocula, lo que genera un alto contenido en péptidos de diferentes tamaños y pesos moleculares, los cuales han sido reportados como agentes bioactivos que pueden modificar a través de diferentes mecanismos la actividad fisiológica de algunas enzimas.

8.2 pH e inhibición de la ECA

Por otro lado los resultados obtenidos de la actividad inhibitoria de estos fermentados se asocian al pH del sustrato siendo así que en pH ácidos (3.0) la actividad inhibitoria es más eficaz que en pH con menor acidez (6.0), esto es probable que se deba, a que la acidez ayuda a desnaturalizar proteínas (Fox, 2001), ya que cuando el pH de la leche disminuye hasta 4.6 se induce una coagulación de las caseínas y a temperaturas superiores a 30 °C estos precipitan fácilmente (Walstra et al., 2006), en el caso de las proteínas del lactosuero se generan procesos de asociación- disociación a pH bajos, por ejemplo la β -lactoglobulina en un pH de 3.0 permanece como un dímero (Cavallieri et al., 2007), sumado a la actividad proteolítica de los lactobacilos generaría una mayor cantidad de péptidos inhibidores de la ECA en menor tiempo que el mostrado en concentraciones más alcalinas, llegando a un punto de saturación en el que esta actividad disminuye al no tener más sustrato disponible; es necesario recordar que la mayoría de los ensayos se han realizado *in vitro* y con la enzima purificada, y que los mejores resultados obtenidos han sido en concentraciones muy ácidas.

Es necesario realizar la purificación de cada uno de los péptidos de acuerdo a tamaño y peso molecular, de estos fermentados, para evaluar y determinar cuál de todos ellos es el que en realidad tiene efecto inhibitorio, además de ello se deben realizar ensayos en cultivos celulares u órganos aislados para comprobar la eficacia de estos péptidos. Es importante resaltar que la gran mayoría de las enzimas son dependientes de ciertos factores como pH, tiempo y concentración del sustrato (Mateo, et al., 2007). Nuestros resultados reportan que fermentados obtenidos entre 24 y 36 horas post inoculación se tienen los mejores porcentajes de inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina, posterior a este tiempo existe una caída lineal y progresiva de la inhibición, con lo que a mayor tiempo post inoculación menor actividad inhibitorias de estos fermentados.

8.3 Tiempo y eficacia de fermentados

El factor tiempo es determinante en la gran mayoría de los procesos biológicos ya que muchos de ellos se rigen a través del ciclo circadiano, sumado a esto como ya se mencionó la actividad de los fermentados útiles son dependientes del tiempo de inoculación, sugiriendo que la curva de crecimiento bacteriano pudiera estar afectando la hidrólisis proteica pues se sabe que toda bacteria tiene un punto máximo de crecimiento y a partir de ahí ya sea por competencia por sustrato o envejecimiento celular disminuirá la actividad de estas bacterias y con ello la hidrólisis y producción de péptidos (Kandler, 1983). Uno de los factores limitantes para el crecimiento y actividad hidrolítica de los bacilos es la cantidad de carbohidratos contenidos en el medio de cultivo pues derivado de ello será la cantidad de ácido láctico y bióxido de carbono producidos durante la fermentación. Este efecto inhibitorio de la hidrólisis lo observamos en los resultados del presente estudio a partir de las 42 horas en el sustrato leche y 36 horas en el sustrato lactosuero; el menor tiempo observado en el efecto inhibitorio en los lactosueros se debe probablemente, no al crecimiento bacteriano, sino a la disminución en la concentración tanto de carbohidratos (47.1 g/L) como de proteínas (7.7 g/L) en este producto. Por otro lado la literatura reporta que no sólo el tiempo y el pH están implicados en la capacidad hidrolítica de los bacilos, se ha observado que *L. helveticus* tiene mayor actividad proteolítica e hidrolítica que otros bacilos ya que sus mecanismos de acción dependen además de pH y sustrato de la utilización de un sistema proteolítico y de transporte más eficiente (Donkor et al., 2007a).

8.4 Péptidos y aminoácidos

Se sabe que uno de los factores de inhibición de los fármacos utilizados para el tratamiento de la hipertensión es justamente el contenido de aminoácidos como la prolina o pequeños péptidos que se unen al sitio alostérico de la enzima impidiendo su actividad biológica por bloqueo (Zhao Y et al., 2008) Con lo que podemos suponer que el uso de fermentados obtenidos de sustratos inoculados

con los diferentes bacilos que contienen proteínas hidrolizadas en forma de pequeños péptidos pueden contribuir al tratamiento de esta enfermedad Razaname, Mutter, & Juillerat, 2004; Saito, Nakamura, Kitazawa, Kawai y Itoh, 2000).

La literatura reporta que uno de los aminoácidos de mayor importancia constituyente de estos péptidos con actividad biológica es la prolina, Donkor (2007b) reporta un alto contenido de prolina en la caseína, proteína que representa el 80 % del contenido total de proteína en la leche sumado a ello se ha reportado que *L. casei* contiene endopeptidasas y aminopeptidasas capaces de hidrolizar la proteína en sus aminoácido terminal C dejando tripéptidos con extremos de prolina lo que los hace biológicamente más activos que algunos otros péptidos con el mismo tamaño pero diferentes aminoácidos. Lo anterior confirma nuestra suposición de que el mejor sustrato para la obtención de fermentados con una mejor capacidad inhibitoria de la actividad de la ECA es la leche ya que está contiene mayor concentración de proteína (caseína) en comparación con los lactosueros (Nakamura et al., 1995a).

8.5 Enzimas e hidrolizados

Existen estudios de la inhibición de la actividad de la ECA *in vitro*, realizados con péptidos obtenidos a través de la hidrolisis enzimática de las globulinas del lactosuero mediante el uso de enzimas digestivas como: pepsina, tripsina y termolisina, donde se ha encontrado que los péptidos obtenidos tienen actividad biológica derivada de su composición de aminoácidos polares sin carga (Hernández B. et al., 2002) lo que los hace completamente hidrofóbicos tendientes a asociarse con los sitios alostéricos de ciertas enzimas como ECA dándoles la propiedad fisiológica de inhibidores o antagonistas competitivos del sustrato. Así como lo observaron Pripp et al en el 2004 que la unión a ECA está fuertemente influenciada por la secuencia C-terminal, por lo que los aminoácidos hidrofóbicos, son más activos si están presentes en cada una de las tres posiciones C-

terminales. Además, la presencia de la carga positiva de Lys (grupo ϵ -amino) y Arg (grupo guanidino) como el residuo C-terminal puede contribuir a la potencia inhibidora.

El hecho de que los sitios catalíticos de ECA tengan requisitos conformacionales diferentes puede indicar que existe la necesidad de desarrollar una mezcla compleja de péptidos, con características conformacionales ligeramente diferentes, a fin de inhibir la actividad de la ECA completamente (Gobbetti et al., 2002)

8.6 Otros Sustratos

Otros estudios realizados con diferentes sustratos (cacahuete) pero con los mismos bacilos han reportado propiedades inhibitorias de la ECA con porcentajes de 32 % (*L. helveticus*) y 20% (*L. casei*) a las 72 horas sin reportar el pH del medio (Zeng, et al., 2013). Lo que apoya nuevamente que el mejor sustrato para el crecimiento de los bacilos y su función hidrolítica de la proteína para la obtención de péptidos bioactivos sigue siendo la leche.

La leche además de ser un sustrato alto en carbohidratos y proteínas es más económico que aquellos sustratos como: semillas, oleaginosas, carnes o derivados y huevo. Una de las principales desventajas de estos sistemas donde se utilizan bacilos para la fermentación y producción de péptido bioactivo es el tiempo de cultivo y características específicas de éste como una atmosfera de CO₂ lo que incrementa el costo de producción comparativamente hablando con aquellos sistemas en los cuales se hidroliza la proteína con enzimas digestivas. Sin embargo *L. helveticus* y *L. casei* han sido utilizados en la industria alimentaria como fuente de enriquecimiento de productos lácteos con la finalidad de obtener alimentos funcionales que cumplan con la función de nutriente pero que además brinden beneficios a la salud a través de sus propiedades curativas, ejemplos de estos tenemos a los productos comerciales como son toda la gama de yogurt,

lactosueros y específicamente, Calpis® (*L. helveticus*) y Yakult® (*L. casei*) (Hata et al., 1996, FitzGerald et al., 2004 y Erdmann, 2008,).

8.7 Lactosuero

Si bien es cierto que la eficacia de inhibición encontrada en el sustrato lactosuero es menor que en el sustrato leche, debemos considerar que este último es un subproducto de la industria láctea el cual generalmente es desechado por considerarlo de poca utilidad, por lo tanto un producto que se pudiera utilizar para la producción de fermentados bioactivos se está desperdiciando. Una de las alternativas que se justifica probar para el mayor rendimiento de este subproducto es quizás la reducción del porcentaje de agua en el mismo para la mayor concentración de los sólidos entre ellos las proteínas lo que proporcionaría un incremento en el sustrato para la obtención de péptidos con actividad biológica. Otra opción para el aprovechamiento de este subproducto puede ser el enriquecimiento del mismo ya sea con carbohidratos y proteína o solo carbohidratos que aporten el sustrato energético de las bacterias.

8.8 Ensayos *in vivo*

Es importante recordar que todo ensayo *in vitro* debe tener sus pruebas en sistemas *in vivo* antes de hacer recomendaciones para su uso en humanos, en la literatura encontramos desafíos de estos productos en ratas de laboratorio donde se encontró que fermentados obtenidos de leche inoculada con *L. helveticus* reduce la actividad de ECA en aorta aislada de estos animales con una sola dosis y en forma crónica (Nakamura et al., 1995b; 1996). Estudios realizados por Mizushima en el 2004 en ratas tratadas con fermentados lácteos de *L. helveticus* no reporta efectos positivos en la inhibición de la ECA ya que tanto la concentración de la angiotensina 1 y 2 se mantienen sin cambio. Se sabe que el efecto inhibitorio de la ECA con los diferentes fármacos es dosis dependiente. Además de ello la medicación de los pacientes hipertensos está relacionada con la

fisiopatología, origen y grado de hipertensión de los mismos. Como se mencionó anteriormente otro de los factores que influyen en la efectividad de la inhibición de ECA por los diferentes productos existentes es la cronobiología de esta, se sabe que los picos de hipertensión en pacientes humanos se presentan durante el día en donde la actividad física es mayor, la variabilidad diurna causa una caída promedio del 15% en la presión arterial durante la noche (Pierdomenico et al., 1997), mientras que en los animales estudiados (ratas) se dan de acuerdo a los hábitos de las mismas durante la noche, encontrando que los episodios de hipertensión se presentan con mayor probabilidad entre la media noche y las 3 de la mañana (Lemmer et al., 1993, Van Den Buuse 1994).

Estudios realizados en pacientes humanos con fermentados de leche inoculados con *L. helveticus* (Seppo et al., 2002, 2003) a dosis de 150 ml reportan disminución de la presión arterial; sin embargo, Tuomilehto (2004) con el mismo sustrato y el mismo bacilo administrado en dos periodos no encuentra diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes con tratamiento y los placebos. Por otro lado Mizuno (2005) reporta disminución de la presión arterial en pacientes que recibieron hidrolizados de caseína obtenidos de *A. oryzae* que contenían tripéptidos (VPP y IPP) a dosis de 1.8 mg (6 semanas) y de 2.5 o 6.3 mg (3 semanas) siendo más efectivo los tratamientos con mayor dosis. Como podemos observar la eficacia de los tratamientos depende de la concentración de los tripéptidos en los fermentados, esto sugiere que la mejor forma de administrar estos tripéptidos es aislándolos de los fermentados y dándolos en concentraciones reales no subjetivas como sería en el fermentado (Nakamura, Masuda y Takano, 1996 y Jauhiainen et al., 2005). Sabemos que la separación de los péptidos de estos fermentados incrementaría el costo del tratamiento, una posible alternativa a esto sería la determinación de la concentración de proteína en estos fermentados y el análisis de la relación de tripéptidos proteína para dosificar la cantidad de fermentado a ingerir con base a esta relación.

Finalmente con base en los resultados obtenidos se sugiere que se utilicen fermentados de leche con 36 horas de inoculación de *L. helveticus* para mejora o tratamiento de hipertensión arterial, recordando siempre que se requieren pruebas *in vivo* que certifiquen la efectividad del producto.

9. Conclusiones

Se concluye que la fermentación de leche y lactosuero de origen caprino con lactobacilos produce fermentados con capacidad de inhibir a la enzima convertidora de angiotensina *in vitro*.

En el presente estudio se observó una diferencia significativa en el tiempo de fermentación con el lactobacilo *L. helveticus*, observando que tiene mayor eficacia para inhibir a la ECA, así como una mayor capacidad de acidificar el medio comparado con *L. casei*.

También podemos determinar que el sustrato leche produce una mejor acción inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina que el sustrato lactosuero. Esto podría deberse a la diferencia en la cantidad de proteínas entre uno y otro así como a la concentración de lactosa presente en los sustratos.

El mejor tiempo para la producción de fermentados de leche que inhiben a la enzima convertidora *in vitro* en este estudio fue a las 36 horas post inoculación con ambos lactobacilos superando el 80% de inhibición.

Se confirmó que *Lactobacillus helveticus* tiene una capacidad alta de inhibir a la ECA de manera *in vitro* en leche y lactosuero de origen caprino mantenidos a 37 °C y una atmosfera de 5% de CO₂.

En estudios posteriores se recomienda realizar las mediciones por cromatografía líquida y la recuperación de las fracciones a los tiempos especificados con mayor porcentaje de inhibición para poder purificar y determinar los péptidos que intervienen en la inhibición de la ECA. Así como realizar un estudio de desafío *in vivo* recomendándose realizarlo en ratas hipertensas espontáneamente para determinar la capacidad para inhibir a la ECA en sujetos experimentales vivos y por consiguiente conocer la capacidad para disminuir la presión sanguínea y poder obtener una dosis efectiva como tratamiento a la hipertensión.

Además de realizar pruebas en sujetos normotensos (presión arterial normal) con fermentados que presenten actividad inhibitoria de la ECA y observar cual es el efecto, ya que podría tener efectos no deseados como hipotensión.

También se recomienda realizar estudios con otras bacterias de uso común en la producción de productos lácteos comerciales como yogurt o leches fermentadas para determinar su capacidad para inhibir a la enzima comparando su acción con *L. helveticus* la cual demostró una alta capacidad para este propósito.

10. Referencias

- Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, et al. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 1997; 336: 1117-1124.
- Ardaillou R. Active fragments of angiotensin II: enzymatic pathways of synthesis and biological effects. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1997; 6: 28-34.
- Bader M, Peters J, Baltatu O, Müller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med* 2001; 79: 76-102.
- Beevers G, Lip GY, O'Brien E. ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. *BMJ* 2001; 322: 912-916.
- Belova LA. Angiotensin II-generating enzymes. *Biochemistry (Mosc)* 2000; 65: 1337-1345.
- Berguer R, Hottenstein OD, Palen TE, Stewart JM, Jacobson ED. Bradykinin-induced mesenteric vasodilation is mediated by B2-subtype receptors and nitric oxide. *Am J Physiol* 1993; 264: G492-496.
- Brock, T.D. & Madigan M.T. 1991. *Biology of microorganisms* (Sixth Edition). Prentice-Hall International (UK) Limited. London.
- Brown NJ, Vaughan DE. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation* 1998; 97: 1411-1420.
- Burnier M. Angiotensin II type 1 receptor blockers. *Circulation* 2001; 103: 904-912.
- Cavallieri FAL., Costa-Netto AP., Menossi M y Da Cunha LR. Whey protein interactions in acid cold-set gels at different pH values. *Lait*. 2006 87: 535-554
- Chianese, L., Garro, G., Mauriello, R., Laezza, P., Ferranti, P., Addeo, F. Occurrence of three novel s1 casein in goat's milk. In: *International Dairy*

Federation (Ed.), Milk protein Polymorphism, Special Issue, 9702. International Dairy Federation 1997, pp. 316–323.

- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, JR., et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003; 289: 2560-2572.
- Chopin, A. 1993. Organization and regulation of genes for amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 21-37
- Coates D. The angiotensin converting enzyme (ACE). *Int J Biochem Cell Biol* 2003, 35: 769-773.
- Cocaign-Bousquet, M., Garrigues, C., Loubiere, P. & Lindley, N. D. 1996. Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 253-267.
- Collins R, Peto R, Macmahon S, Hebert P, Fiebach NH, Eberlein KA, et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2, Short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet* 1990; 335: 827-838.
- Collins, M.D., U.M. Rodrigues, C. ASH, M. Aguirre, J.A.E. Farrow, A. Martinez-Murcia, B.A. Phillips, A.M. Williams & Wallbanks S. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol Lett* 1991, 77:5-12.
- Cowley AW, JR. Long-term control of arterial blood pressure. *Physiol Rev* 1992; 72: 231-300.
- Crowley SD, Gurley SB, Herrera MJ, Ruiz P, Griffiths R, Kumar AP, et al. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 17985-17990.
- Cushman, D. W., & Cheung, H. S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol* 1971, 20, 1637–1648

- De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 415-472.
- Donkor, O. N., Henriksson, A., Singh, T. K., Vasiljevic, T. & Shah, N. P. ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *Int. Dairy J.* 2007a, 17, 1321-1331.
- Donkor, O., Henriksson, A., Vasiljevic, T., & Hah, N. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Lait* 2007b, 86,
- Erdmann, K., Cheung, B. W. Y. & Schröder, H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *J. Nutr. Biochem.* 2008, 19, 643-654
- Fitzgerald RJ, Meisel H. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Br J Nutr* 2000; 84 Suppl 1: S33-37.
- Fitzgerald, R. J. & Meisel, H. Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In: FOX, P. F. & MCSWEENEY, P. L. H. (eds.) *Advanced dairy chemistry 2003, Vol. 1: Proteins* 3rd ed. New York, NY, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers
- Fitzgerald, R. J., Murray, B. A., & Walsh, G. J. Hypotensive peptides from milk proteins. *J. Nutr.* 2004, 134, 980S–988S.
- Foegeding, E.A., Davis, J.P., Doucet, D., & McGuffey, M.K. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends Food Sci Technol* 2002, 13(5), 151-159
- Fox, P. F. Milk proteins as food ingredients. *Int J Dairy Technol* 2001, 54, 41-55.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M. & McSweeney, P. L. H. *Chemistry of milk constituents.* In *Fundamentals of Cheese Science.* Gaithersburg, MD.: Aspen Publishers 2000.

- Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A., & Cagno, R. D. Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2002, 42, 223–239
- Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M., & Recio, I. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *Int. Dairy J.* 2004, 14, 1075–1080.
- Gottschalk G. *Bacterial Metabolism*. 2. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo 1986.
- Grassi G, Cattaneo BM, Seravalle G, Lanfranchi A, Mancia G. Baroreflex control of sympathetic nerve activity in essential and secondary hypertension. *Hypertension* 1998; 31: 68-72.
- Grosclaude, F., Mahé, M.F., Brignon, G., Di Stasio, L., Jeunet, R. A Mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat *cs1* casein. *Genet Sel. Evol* 1987. 19, 399–412.
- Grosclaude, F., Martín, P. Casein polymorphism in the goat. In: International Dairy Federation (Ed.), *Milk Protein Polymorphism, Special Issue*, 9702. International Dairy Federation 1997, Brussels, Belgium, pp. 241– 253.
- Grosclaude, F., Martin, P. Casein polymorphisms in the goat. In: *Milk Protein Polymorphism*, vol. 9702. IDF 1997, pp. 241–253.
- Ha, E. & Zemel, M. B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). *J. Nutr. Biochem.* 2003, 14, 251-258.
- Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* 1990; 70: 1067-1116.
- HAENLEIN, G.F.W. Goat milk in human nutrition. *Small Rumin. Res* 2004. 51, 154–163

- Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y., & Takano, T. A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 1996, 64, 767–771.
- Hernández, B., Recio, I., Ramos, M., & Amigo, L. Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *Int. Dairy J* 2002. 12, 805–812.
- Hersh LB, Gafford JT, Powers JC, Tanaka T, Erdös EG, Novel substrates for angiotensin I converting enzyme, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983, 110, 654-659
- Hu WY, Fukuda N, Ikeda Y, Suzuki R, Tahira Y, Takagi H, et al. Human-derived vascular smooth muscle cells produce angiotensin II by changing to the synthetic phenotype. *J Cell Physiol* 2003; 196: 284-292.
- Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 Informe Final de Resultados. Disponible desde: http://oment.uanl.mx/wp-content/uploads/2016/12/ensanut_mc_2016-310oct.pdf
- Jauhiainen, T., Collin, M., Narva, M., Cheng, Z. J., Poussa, T., Vapaatalo, H., et al. Effect of long-term intake of milk peptides and minerals on blood pressure and arterial function in spontaneously hypertensive rats. *Milchwissenschaft* 2005, 60, 358–363.
- Jelen, P. Whey processing: Utilization and products. En H. Roginski, J.W. Fuquay, & P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* 2003 (Vol. 4) (2739-745). Londres: Academic Press (Elsevier Science).
- Jelen, P. Whey: composition, properties, processing and uses. En Y.H. Hui, *Encyclopedia of food science and technology* 1992 (2835-2845). New York: John Wiley & Sons (Wiley-Interscience Publication)
- Juarez, M., RAMOS, M. Physico-chemical characteristics of goat milk as distinct from those of cow milk. In: *International Dairy Federation* (Ed.),

Proceedings of the IDF Seminar Production and Utilization of Ewe's and Goat's Milk, Bulletin No. 202. Athens, Greece 1986, pp. 54–67.

- Kanagy NL. Alpha (2)-adrenergic receptor signalling in hypertension. Clin Sci (Lond) 2005; 109: 431-437.
- Kandler, O. & WEISS N. Regular, non-sporing Gram-positive rods, in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2 (P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, y J. G. Holt, eds.), Williams and Wilkins, Baltimore 1986, pp.1208-1234.
- Kandler, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 1983, 49:209-224.
- Kannel WB, Wilson PW, Nam BH, D'agostino RB, LI J. A likely explanation for the J-curve of blood pressure cardiovascular risk. Am J Cardiol 2004; 94: 380-384.
- Kannel WB, Wolf PA, Verter J, McNamara PM. Epidemiologic assessment of the role of blood pressure in stroke: the Framingham Study. 1970. JAMA 1996; 276: 1269-1278.
- Karaki H, Doi K, Sugano S, Uchiwa H, Sugai R, Murakami U, et al. Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. Comp Biochem Physiol C 1990; 96: 367-371.
- Kilpi, E. E. R., Kahala, M. M., Steele, J. L., Pihlanto, A. M. & Joutsjoki, V. V. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in milk fermented by wild-type and peptidase-deletion derivatives of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. Int Dairy J 2007, 17, 976-984.
- Kim Y.-K., Yoon, S., Yu, D.-L., Lönnerdal, B., & Chung, B.-H. Novel angiotensin- I -converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human α 1-casein expressed in Escherichia coli. J of Dairy Research 1999, 66, 431-439.
- Korhonen, H. J. Bioactive milk proteins and peptides: From science to functional applications. Aust J Dairy Technol 2009, 64, 16-25.

- Korhonen, H., Pihlanto-Leppälä, A., Rantamäki, P. & Tupasela, T. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends Food Sci Technol* 1998, 9, 307-319
- Kramkowski K, Mogielnicki A, Buczek W. The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57: 529-539.
- Kunji, E. R. S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B. & Konings, W. N.. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 1996, 70, 187-221.
- Leclerc, Pierre-Louis & Gauthier, Sylvie & Bachelard, Hélène & Santure, Marta & Roy, Denis. Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *Int Dairy J.* 2002. 12. 995-1004.
- Lemmer, B, Mattes, A, Böhm, M, Ganten, D. Circadian blood pressure variation in transgenic hypertensive rats. *Hypertension.* 1993; 22: 97-101
- Li, G., Qu, M., Wan, J., & You, J. Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with *in vivo* angiotensin I- converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007, 16, 275-280.
- Lohmeier TE. The sympathetic nervous system and long-term blood pressure regulation. *Am J Hypertens* 2001; 14: 147S-154S.
- López R, Otte J, & Van Camp J. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *Int Dairy J* 2006, 16, 1277-1293.
- López-Fandiño R, Otte J, Van Camp J. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *Int Dairy J* 2006; 16: 1277-1293.
- Luft FC. Workshop: mechanisms and cardiovascular damage in hypertension. *Hypertension* 2001; 37: 594-598.

- Maeno M, Yamamoto N, Takano T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci* 1996; 79: 1316-1321.
- Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G et al. Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens*. 2007;25:1105-1187.
- Martin, P., Ferranti, P., Leroux, C., Addeo, F. Non-bovine caseins quantitative variability and molecular diversity. In: Fox, P.F., Mc Sweeney (Eds.), *Advances in Dairy Chemistry, Proteins* 2003, vol. 1, 3rd ed, pp. 277–310, Part A
- Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan J, Fernandez-Lafuente R, Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme Microb Technol* 2007, 40, 1451-1463.
- Meisel, H. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. *Livestock Production Science* 1997, 50, 125–138.
- Mensink, R. P. Dairy products and the risk to develop type 2 diabetes or cardiovascular disease. *Int Dairy J* 2006, 16, 1001-1004.
- Mervaala E, Müller D, Schmidt F, Park J-K, Gross V, Bader M, et al. Blood pressure - Independent effects in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension* 2000; 35: 587-594.
- Miao CY, Xie HH, Zhan LS, Su DF. Blood pressure variability is more important than blood pressure level in determination of end-organ damage in rats. *J Hypertens* 2006; 24: 1125-1135.
- Mizuno, S., Nishimura, S., Matsuura, K., Gotou, T., & Yamamoto, N. Release of short and proline-rich antihypertensive peptides from casein hydrolysate with an *Aspergillus oryzae* protease. *J Dairy Sci* 2004, 87, 3183–3188.

- Mizushima S, Ohshige K, Watanabe J, Kimura M, Kadowaki T, Nakamura Y, et al. Randomized controlled trial of sour milk on blood pressure in borderline hypertensive men. *Am J Hypertens* 2004; 17: 701-706.
- Möller, N., Scholz-Ahrens, K., Roos, N. & Schrezenmeir, J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur J Nutr* 2008, 47, 171-182.
- Mullally MM, Meisel H, Fitzgerald RJ. Synthetic peptides corresponding to alphas-lactalbumin and beta-lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1996; 377: 259-260.
- Müller DN, Mervaala EM, Dechend R, Fiebeler A, Park JK, Schmidt F, et al. Angiotensin II (AT(1)) receptor blockade reduces vascular tissue factor in angiotensin II-induced cardiac vasculopathy. *Am J Pathol* 2000; 157: 111-122.
- Nakamura Y, Masuda O, Takano T. Decrease of tissue angiotensin I-converting enzyme activity upon feeding sour milk in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996; 60: 488-489.
- Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Okubo A, Yamazaki S, Takano T. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J Dairy Sci* 1995a; 78: 777-783.
- Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Takano T. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *J Dairy Sci* 1995b; 78: 1253-1257.
- Navar LG. The kidney in blood pressure regulation and development of hypertension. *Med Clin North Am* 1997; 81: 1165-1198.
- Nelson, D.L. & Cox M.M. 2001. *Lehninger Principios de Bioquímica* (tercera edición). Ediciones Omega. Barcelona.

- Ondetti MA, Cushman DW. Angiotensin-converting enzyme inhibitors: biochemical properties and biological actions. *CRC Crit Rev Biochem* 1984; 16: 381-411.
- Orlov S, Resink TJ, Bernhardt J, Ferracin F, Buhler FR. Vascular smooth muscle cell calcium fluxes. Regulation by angiotensin II and lipoproteins. *Hypertension* 1993; 21: 195-203.
- Palatini P. Sympathetic overactivity in hypertension: a risk factor for cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep* 2001; 3 Suppl 1: S3-9.
- Park, Y.W. Goat milk—chemistry and nutrition. In: Park, Y.W., Haenlein, G.F.W. (Eds.), *Handbook of Milk of Non-bovine Mammals*. Blackwell Publishing Professional, Oxford, UK/Ames, Iowa 2006, pp. 34–58.
- Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S. & Kim, H. Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol* 2006, 100, 1171-1185.
- Pellegrini, O., Remeuf, F., Rivemale, M. Evolution of physicochemical characteristics and renneting properties of ewe's milk collected in "Roquefort area". *Lait* 74, 1994, 425–442.
- Pierdomenico SD, Lapenna D, Guglielmi MD, Costantini F, Romano F, Schiavone C, et al. Arterial disease in dipper and nondipper hypertensive patients. *Am J Hypertens* 1997; 10: 511-8.
- Pihlanto-Leppälä A, Rokka T, Korhonen H. Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Bovine Milk Proteins, *Int Dairy J* 1998, 8, 325-331.
- Pihlanto-Leppälä A., Koskinen P., Piilola K., Tupasela T., & Korhonen H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *J Dairy Res* Feb 2000, 67(1):53-64.

- Pihlanto-Leppälä, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends Food Sci Technol* 2001, 11, 347–356.
- Pintado, M.E., Macedo, A.C., & Malcata, F.X. Review: Technology, chemistry and microbiology of whey cheeses. *Food Sci Technol Int* 2001, 7(2), 105-116.
- Pirisi, A., Lauret, A., Dubeuf, J.P. Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality. *Small Rumin* 2007. Res. 68, 167–178.
- Pripp, A. H., Isaksson, T., Stepaniak, L., & Sorhaug, T. Quantitative structure-activity relationship modelling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins. *Eur Food Res Technol* 2004, 219, 579–583.
- Psathas, G. Halloumi Cheese Case Study of Cyprus. IDF 0501, part 2 2005, pp. 90–97.
- Rachid, M., Matar, C., Duarte, J. & Perdigon, G. Effect of milk fermented with a *Lactobacillus helveticus* R389(+) proteolytic strain on the immune system and on the growth of 4T1 breast cancer cells in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006, 47, 242-253.
- Remeuf, F., Cossin, V., Denvin, C., Lenoir, J., Tomassone, R. Relationships between physico-chemical characteristics of milk s and their cheese making properties. *Lait* 71, 1991, 397–4 21.
- Roberfroid, M. B. Concepts in functional foods: The case of inulin and oligofructose. *J Nutr* 1999, 129, 1398S-1401S.
- Robert MC, Razaname A, Mutter M, Juillerat MA. Identification of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 6923-6931.
- Rojas R. 2009. Tesis de Maestría Perfil de péptidos bioactivos durante la fermentación de leche por *Lactobacillus casei* y *Streptococcus thermophiles*, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, México.

- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., & Itoh, T. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in gouda cheese. *J Dairy Sci* 2000, 83, 1434–1440.
- Savijoki, K., Ingmer, H. & Varmanen, P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, 71, 394-406.
- Savoia C, Ebrahimian T, He Y, Gratton JP, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin II/AT2 receptor-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats involves nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase. *J Hypertens* 2006; 24: 2417-2422.
- Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP, Schmidt BM. Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *Lancet* 2007; 369: 1208-1219.
- Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T., & Korpela, R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr* 2003, 77, 326–330.
- Seppo, L., Kerojoki, O., Suomalainen, T., & Korpela, R. The effect of a *Lactobacillus helveticus* LBK-16H fermented milk on hypertension: A pilot study on humans. *Milchwissenschaft* 2002, 57, 124–127
- Shah, N. P. Functional cultures and health benefits. *Int Dairy J*, 17 2007, 1262-1277.
- Shah, N. P. Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technol* 2001, 55, 46.
- Smithers, G.W. Whey and whey proteins - From 'gutter-to-gold'. *Int Dairy J* 2008, 18(7), 695-704.
- Su JB. Kinins and cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 3423-3435.
- Sung CP, Arleth AJ, Storer BL, Ohlstein EH. Angiotensin type 1 receptors mediate smooth muscle proliferation and endothelin biosynthesis in rat vascular smooth muscle. *J Pharmacol exp Ther* 1994; 271: 429-437.

- Swaisgood, H. E. Chemistry of the caseins. In: F., F. P. (ed.) Advanced dairy chemistry, I. Protein. London: Elsevier 1992.
- Tatasciore A, Renda G, Zimarino M, Soccio M, Bilo G, Parati G, et al. Awake systolic Blood Pressure variability Correlates with target-organ Damage in Hypertensive subjects. *Hypertension* 2007; 50: 325-332.
- Tudor, M., Havranek, J. & Serafini, M. Dairy foods and body weight management. *Mljekarstvo* 2009, 59, 88-95.
- Tuomilehto, J., Lindstrom, J., Hyyrynen, J., Korpela, R., Karhunen, M. L., Mikkola, L., et al. Effect of ingesting sour milk fermented using *Lactobacillus helveticus* bacteria producing tripeptides on blood pressure in subjects with milk hypertension. *J Hum Hypertens* 2004, 18, 795–802.
- Van Den Buuse, M. Circadian rhythms of blood pressure, heart rate, and locomotor activity in spontaneously hypertensive rats as measured with radio-telemetry, *Physiol Behav* 1994, 55, 783-787,
- Vaughan, E. E., David, S. & De Vos, W. M. The lactose transporter in *Leuconostoc lactis* is a new member of the LacS subfamily of galactoside-pentosehexuronide translocators. *Appl Environ Microbiol* 1996, 62, 1574-1582.
- Villegas De Gante, A. *Tecnologia Quesera Mexico* 2004. Editorial Trillas
- Walstra, P. Casein sub-micelles: do they exist? *Int Dairy J* 1999, 9, 189-192.
- Walstra, P., Wouters J.T y Geurts T.J. 2006. *Dairy Science and Technology*. Segunda edición. CRC. EE.UU. 763 p.
- Whitworth JA. World Health organization (WHO)/international society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens* 2003; 21: 1983-1992.
- Wyss JM, Carlson SH. The role of the central nervous system in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 1999; 1: 246-253.
- Zeng, Y., Wang, N., & Qian, W. Production of angiotensin I Converting enzyme inhibitory peptides from Peanut meal fermented with lactic acid

bacteria and facilitated with protease. Advance J Food Sci Technol 2013, 9, 1198-1203.