

Posgrado Alimentos funcionales.

Leches fermentadas: actividad biológica de la fracción no bacteriana.

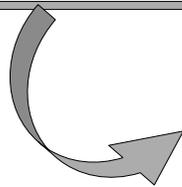
Analía G Abraham

Centro de Investigación y Desarrollo en
Criotecología de Alimentos

Área Bioquímica y Control de Alimentos. Facultad
de Ciencias Exactas UNLP- CONICET. La Plata. Argentina



Leche fermentada



**Bacterias y levaduras
viables**

ácidos orgánicos

etanol, CO₂

**otros compuestos del
metabolismo bacteriano**

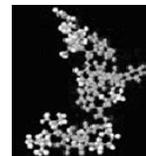
**Productos bioactivos
generados por acción de
microorganismos**

Componentes de la fracción no bacteriana con actividad biológica

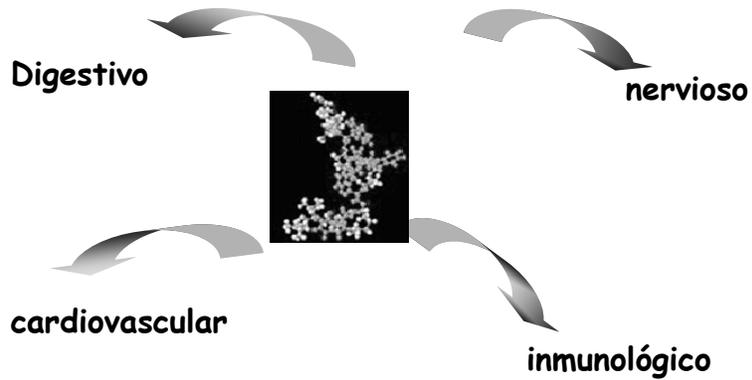
- **Exopolisacáridos**
- **Péptidos bioactivos**
- **Proteínas microbianas**

Péptidos bioactivos

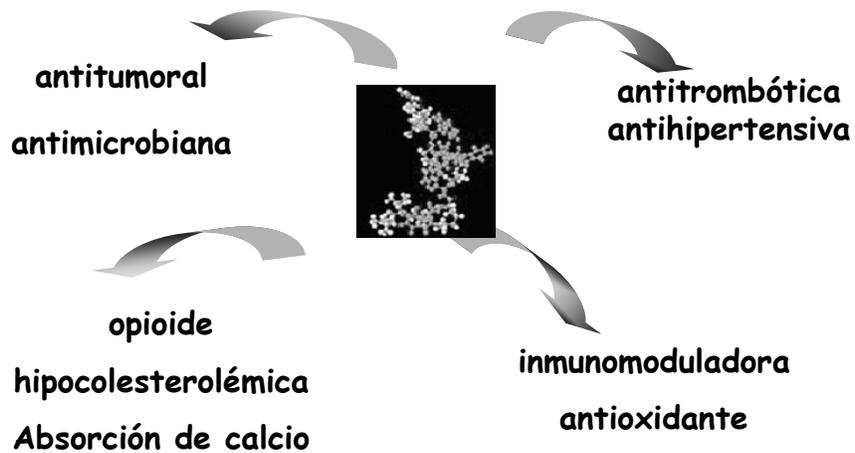
Se han definido como fragmentos específicos de proteínas que poseen un impacto en las funciones del organismo y que finalmente se ven reflejados en el la salud



Péptidos bioactivos



Actividades biológicas de péptidos



Características de los péptidos bioactivos

En general poseen entre 2 y 20 aas

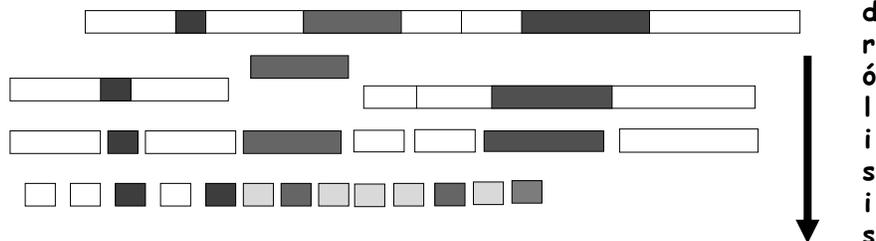
Su actividad es función de la composición de aas
y de la secuencia

Muchos tiene mas de una actividad biológica

Existen bases de datos donde se encuentran
registrados péptidos bioactivos de distinto origen

Liberación de péptidos encriptados

- ▬➔ Proceso de digestión *in vivo*
- ▬➔ Hidrólisis enzimática *in vitro*
- ▬➔ Acción de microorganismos
- ▬➔ Combinación de procedimientos

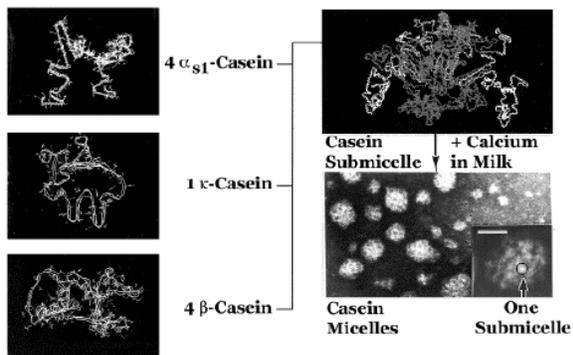


Proteinas de leche

Proteinas		
Caseinas	80	
α -caseinas	42	
β -caseinas	25	
κ -caseinas	9	
Proteinas de suero	20	Lactoperoxidasa Lactoferrina Inmunoglobulinas
α -lactalbumin	4	
β -lactoglobulin	9	

Source: Fennema, O.R. Food Chemistry, Third Edition, pg. 847

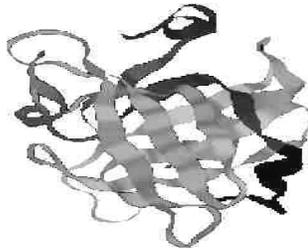
Predicted Three Dimensional Structures for Bovine Caseins



Proteínas de suero



a-Lactalbumina



b-Lactoglobulina

- Glicomacropéptidos
- Seroalbúmina bovina
- Lactoferrina
- Lactoperoxidasa
- Lisozima

Proteínas de leche como fuente de péptidos bioactivos

Sistema cardiovascular



Péptidos antitrombóticos
Péptidos antihipertensivos

Sistema nervioso



Péptidos opioides (agonistas y antagonistas)

Sistema inmune



Péptidos inmunomoduladores
Péptidos antimicrobianos

Nutrición



Caseinofosfopéptidos
Glicomacropéptido

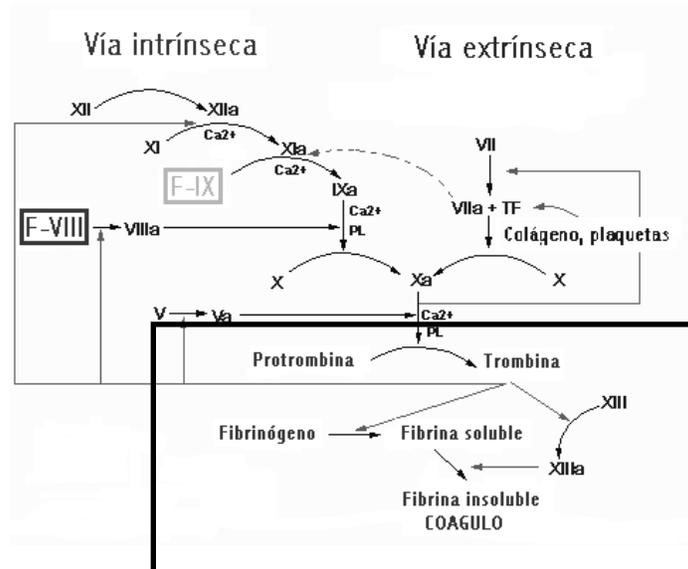
❖ El mecanismo involucrado en la coagulación enzimática de la leche es semejante al mecanismo de coagulación de la sangre (interacción fibrinógeno con trombina).

❖ Residuos C terminal 106-116 de K caseína posee homología estructural con el C terminal del fibrinógeno

❖ Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Gln-Asp-Lys (secuencia semejante al γ -fibrinógeno)

❖ el fragmento más pequeño 106-112, 112-116 también tiene actividad

(Bouhallab *et al.*, 1992).



Sistema cardiovascular

Antitrombóticos

Casoplatelinas:

inhiben agregación de plaquetas

inhiben interacción de fibrinógeno con los receptores específicos en las plaquetas

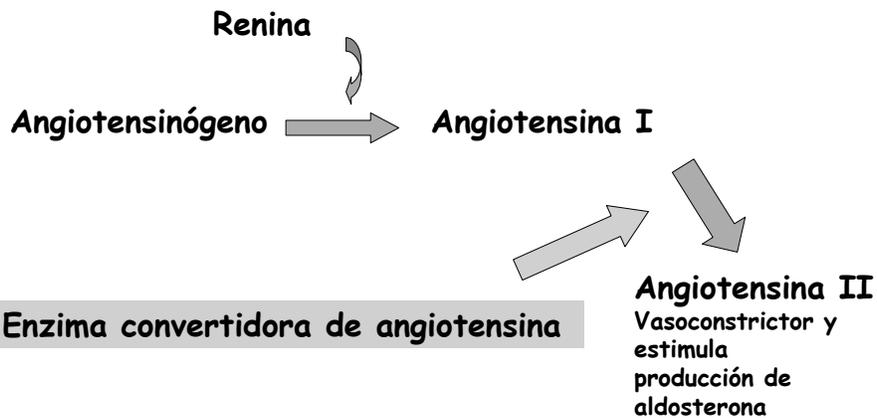
Otros péptidos inhiben solo una de las vías

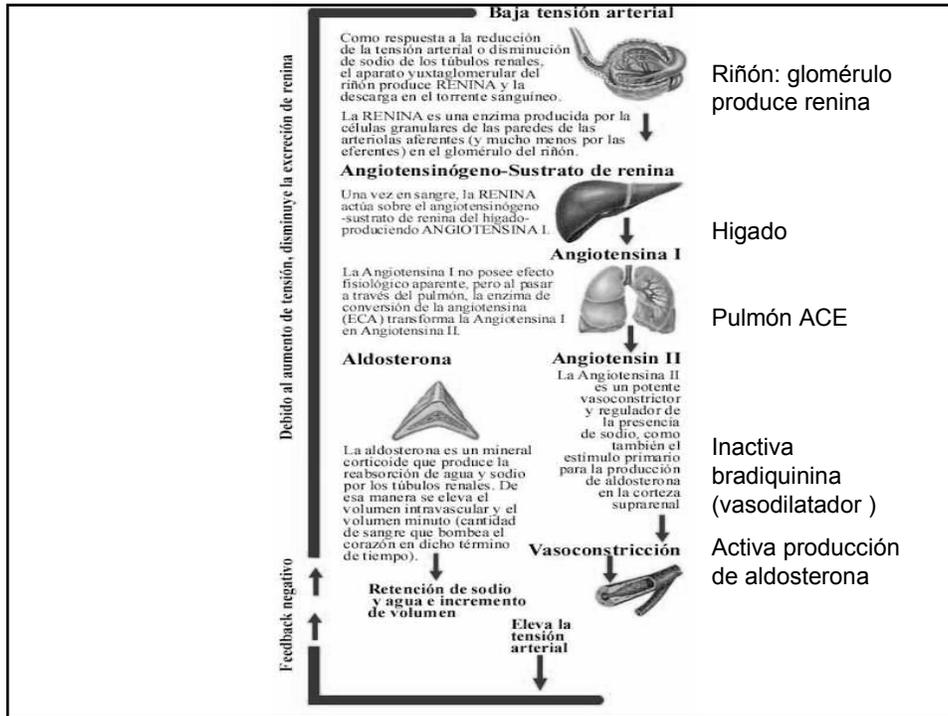
Se determinó la presencia de péptidos antitrombóticos en plasma de recién nacidos y en estómago, duodeno y sangre de adultos

Sistema cardiovascular

Péptidos Antihipertensivos

Regulación de la presión sanguínea





Sistema cardiovascular

Péptidos Antihipertensivos

Péptidos inhibidores de ACE

Casoquininas
lactoquininas

α , β caseins

Residuos 23-27 de α casein (Phe-Phe-Val-Ala-Pro)

Residuos 177-183 de β casein (Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg)

Péptidos inhibidores de ACE

Fermentación
L helveticus
L delbriueckii
subsp bulgaricus
Lc lactis
Saccharomyces

TABLE 3. ACE-inhibitory activities of crude peptide fractions and synthesized peptides

Crude peptide fraction or synthesized peptide	IC ₅₀	
	mg/liter	μmol/liter
Crude peptide fraction 15 from <i>L. delbriueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> SS1	11.2	ND ^a
Crude peptide fraction 16 from <i>L. delbriueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> SS1	10.3	ND
Crude peptide fraction 13 from <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> FT4	8.0	ND
β-CN f6-14 from crude peptide fraction 15	290.7	300.1
β-CN f73-82 from crude peptide fraction 16	179.8	173.3
β-CN f47-52 from crude peptide fraction 13	193.9	256.8
κ-CN f152-160 from crude peptide fraction 13	>1,000.0	>1,000.0

^aND, not determined.

Gobbeti et al 2000

Péptidos inhibidores de ACE

Leche fermentada

Lb helveticus y Saharomyces cereviceae

Ile-Pro-Pro,

Val-Pro-Pro,

Ingesta oral en ratas hipertensas baja presión sanguínea

Péptidos inhibidores de ACE

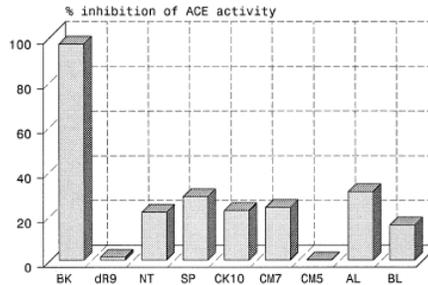


Fig. 2. Inhibition of ACE activity by endogenous and milk protein-derived peptides (at $100 \mu\text{mol L}^{-1}$). The data represent the percentage inhibition of activity compared with control (no peptide inhibitor present) (13). BK = bradykinin (RPPGF-SPFR); dR9 = desArg⁹-Bradykinin; NT = neurotensin (pyro-ELYENKPRPYIL); SP = substance P (RPKPPQFFGLM-NH₂); CK10 = β -casokinin-10; CM7 = β -casomorphin-7; CM5 = β -casomorphin-5; AL = α -lactorphin; BL = β -lactorphin.

Péptidos inhibidores de ACE

ACE es una enzima con dos sitios catalíticos, uno en cada lóbulo en la porción extracelular

- ACE prefiere sustratos o inhibidores competitivos conteniendo aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos o ramificados) en C-terminal
- prolina, lysina, arginina

Actividad antimicrobiana

Proteínas

α caseins
lactoferrina

- ❖ Caseicidina
(quimosina)
- ❖ casocidina
- ❖ isracidina
- ❖ kappacina
- ❖ Lactoferricina
(pepsina)

Antimicrobianos

Caseicidina
casocidina
isracidina
kappacina
lactoferricina

Staphylococcus spp.,
Sarcina spp.,
Bacillus subtilis,
Diplococcus pneumoniae
Streptococcus pyogenes

Escherichia coli
S. carnosus

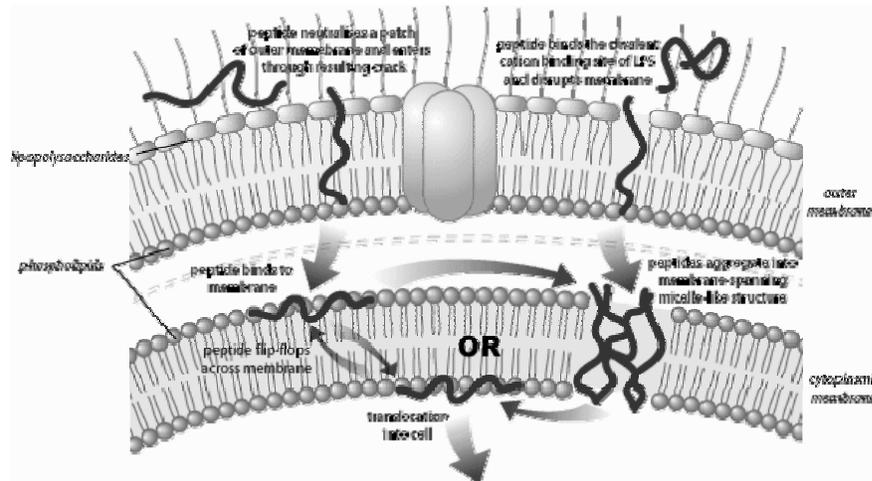
S. aureus
Candida albicans;



Poseen aa básicos que forman un
bucle de α -hélice

Son péptidos catiónicos

Cationic peptides



Efecto Inmunomodulatorio

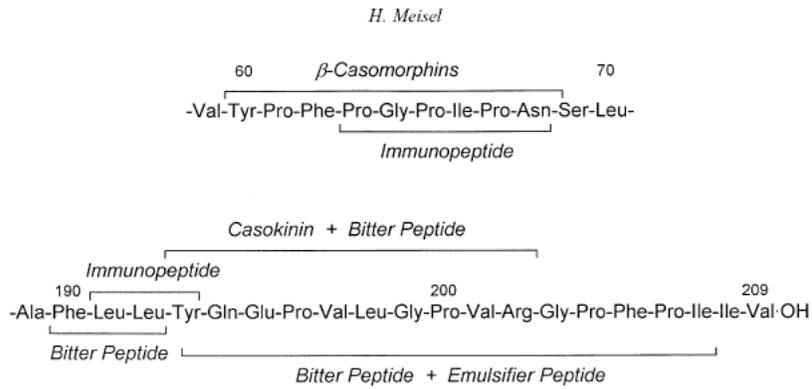
❖ α 1-caseinas (residuos 194-199):
Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp

❖ B-caseinas (residuos 63-68 y 191-193)
**Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn
Leu-Leu-Tyr).**

Estimulan la actividad de los
macrófagos

modulan la función de los
linfocitos

Efecto Inmunomodulatorio

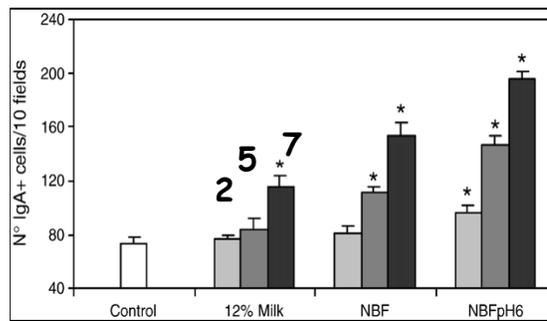


Modulan la proliferación de linfocitos

Efecto Inmunomodulatorio

Efecto de la fracción no bacteriana de la leche fermentada con *L. helveticus* R389

Células productoras de IgA en lámina propia de intestino delgado

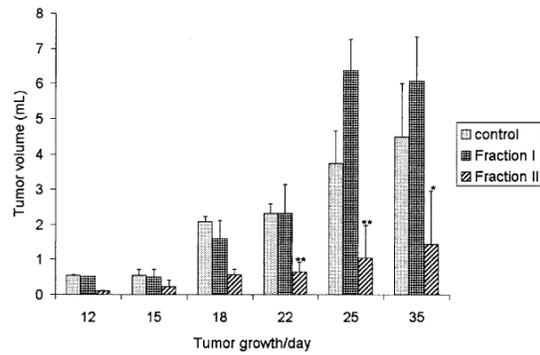


Vinderola et al 2007

Efecto Inmunomodulatorio

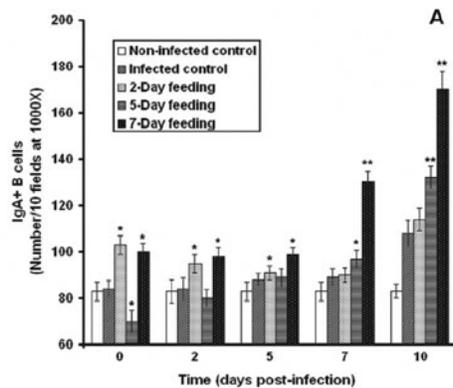
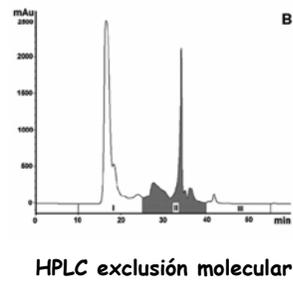
Efecto de la ingesta de fracciones de leche fermentada con *L. helveticus*

B)

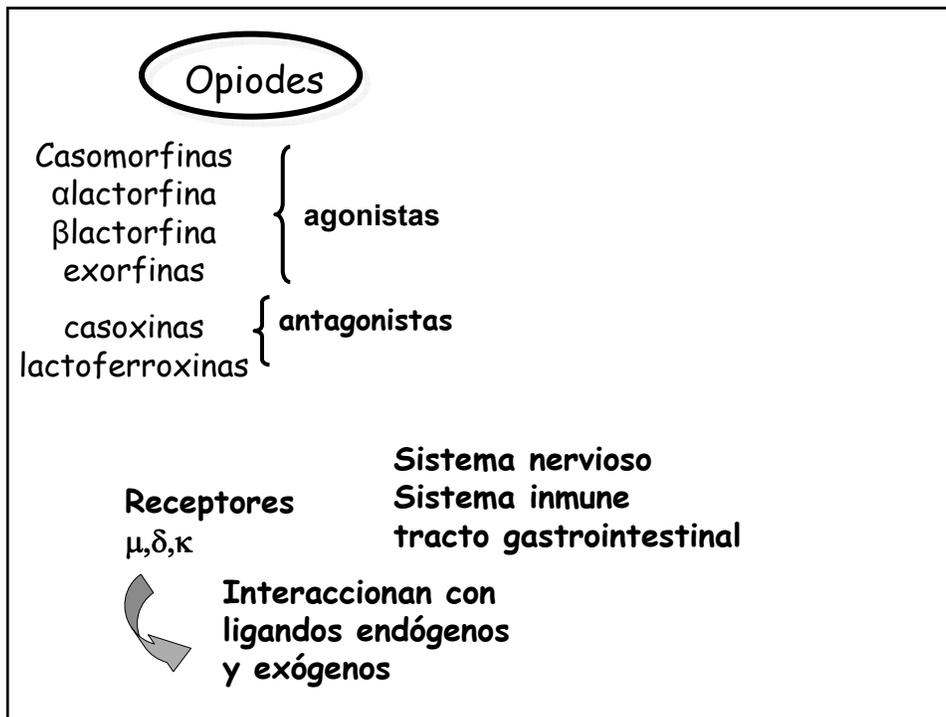


LeBlanc et al 2000

Efecto Inmunomodulatorio



LeBlanc et al 2000



Sistema nervioso

Actividad opioide

Bioactive peptide	Protein precursor	Bioactivity
Casomorphins	α -, β -Casein	Opioid agonist
α -Lactorphin	α -Lactalbumin	Opioid agonist
β -Lactorphin	β -Lactoglobulin	Opioid agonist
Lactoferroxins	Lactoferrin	Opioid antagonist
Casoxins	κ -Casein	Opioid antagonist

Características comunes en agonistas: poseen Tyr asociado a phe o tyr en el N ter

Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu

Tyr-Gly-Leu-Phe

Meisel 1999

Sistema nervioso

Actividad opioide

Bioactive peptide	Protein precursor	Bioactivity
Casomorphins	α -, β -Casein	Opioid agonist
α -Lactorphin	α -Lactalbumin	Opioid agonist
β -Lactorphin	β -Lactoglobulin	Opioid agonist
Lactoferroxins	Lactoferrin	Opioid antagonist
Casoxins	κ -Casein	Opioid antagonist

Características comunes en antagonistas:

Ser-Arg-Tyr-Pro-Ser-Tyr-OCH₃

Meisel 1999

Nutrición

Caseinofosfopéptidos

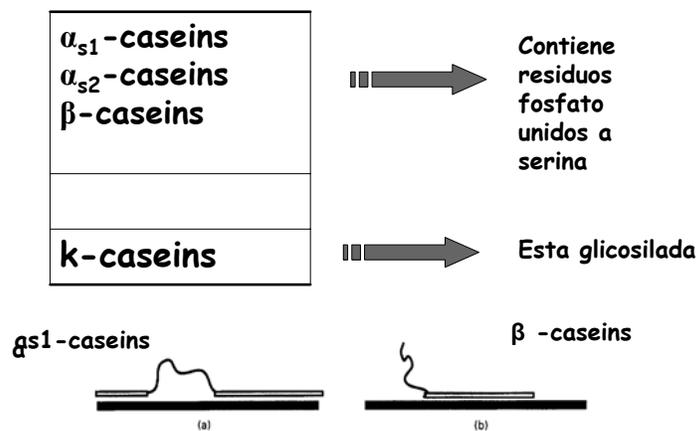


Fig. 1. Schematic diagrams, based on predictions of self-consistent-field calculations, depicting typical conformations of (a) α_{s1} -casein and (b) β -casein adsorbed onto planar hydrophobic interface. Bars are simply used to denote hydrophobic regions of molecules and do not imply rigidity.

Nutrición

Caseinofosfopéptidos

Son péptidos con alta carga negativa que los protege de ser hidrolizados por enzimas digestivas

Unen calcio, magnesio y hierro y favorecen su absorción

Primary sequences of caseinophosphopeptides derived from α -caseins and β -caseins

Otros metales : Zn

-Casein (fragment)	Sequence
α_{s1} -f(59-79)	-gln-met-glu-ala-glu-ser(P)-ile-ser(P)-ser(P)-ser(P)-glu-glu-ile-val-pro-asn-ser(P)-val-glu-gln-lys-
α_{s1} -f(112-119)	-val-pro-asn-ser(P)-ala-glu-glu-arg-
α_{s2} -f(5-18)	-glu-his-val-ser-ser(P)-ser(P)-glu-glu-ser-ile-ile-ser(P)-gln-glu-
α_{s2} -f(29-34)	-asn-pro-ser(P)-lys-glu-asn-
α_{s2} -f(55-64)	-gly-ser(P)-ser(P)-ser(P)-glu-glu-ser(P)-ala-glu-val-
α_{s2} -f(127-147)	-gln-leu-ser(P)-thr-ser(P)-glu-glu-asn-ser-lys-lys-thr-val-asp-met-glu-ser(P)-thr-glu-val-phe-
β -f(12-23) (variant A)	-ile-val-glu-ser(P)-ser(P)-ser(P)-glu-glu-ser-ile-lys-
β -f(12-23) (variant D)	-ile-val-glu-ser(P)-lys-ser(P)-glu-glu-ser-ile-lys-

Aimutis 2004

Nutrición

Caseinofosfopéptidos

Poseen efecto anticariogénico a través de la recalcificación del esmalte dental

Son inestables al calor porque induce desfosforilación

Aimutis 2004

Nutrición

glicomacropéptido

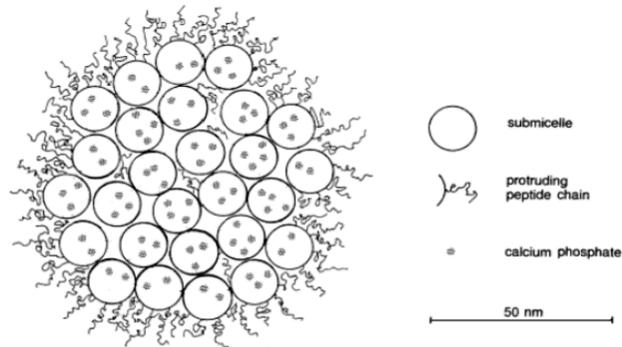


Figure 7. The structure of casein micelle in the sub-micelles model showing the protruding C-terminal parts of κ -casein as proposed by Walstra. (Source: Walstra, 1999)

Nutrición

glicomacropéptido

GMP: Residuos 106-116 de κ caseína

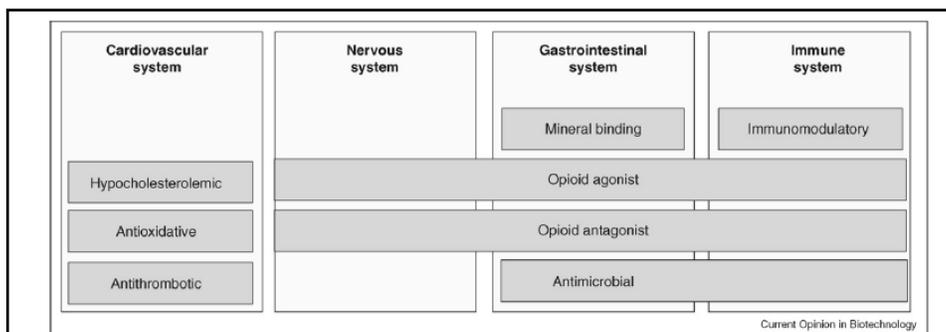
Es hidrolizado por enzimas digestivas

Efectos biológicos

Da saciedad

Fuente de treonina

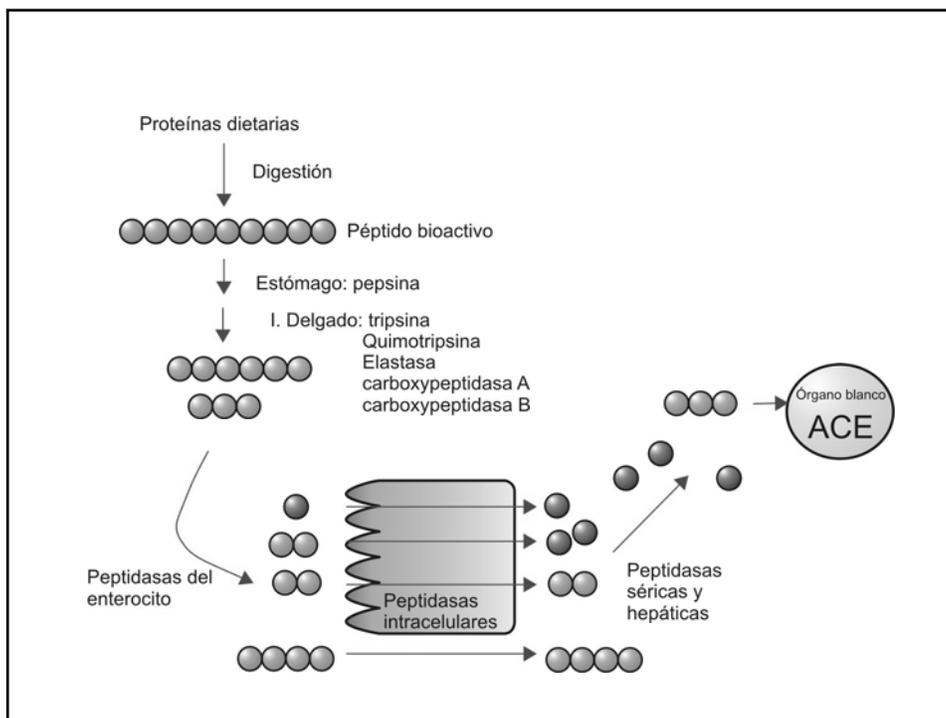
Favorece absorción de calcio, zinc y hierro



Overview of the beneficial effects ascribed to bioactive peptides derived from food proteins.

Tabla 1 Péptidos bioactivos y sus efectos beneficiosos para el organismo.

Péptidos	Efecto beneficioso
Immunomoduladores	Estimulan la respuesta inmune
Inhibidores del enzima convertidor de angiotensina	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Antioxidantes	Previenen enfermedades degenerativas y envejecimiento
Reguladores del tránsito intestinal	Mejoran la digestión y absorción
Reguladores de la proliferación celular	Reducen la proliferación de tumores cancerígenos
Antimicrobianos	Reducen el riesgo de infecciones
Quelantes	Mejoran la absorción de minerales y metales
Hipocolesterolémicos	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Anticoagulantes	Reducen los riesgos de padecer trombos



- di y tripéptidos: transportador dependiente de H⁺ PepT1.
- tetra-octapéptidos: paracelular
- nonapéptidos hidrofobicos: endocitosis

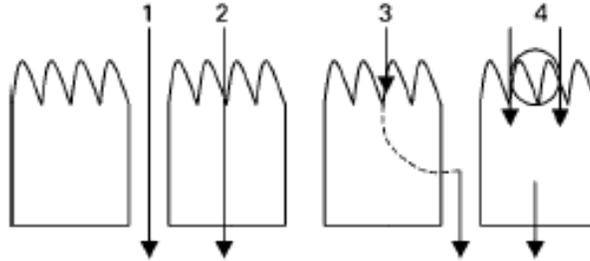


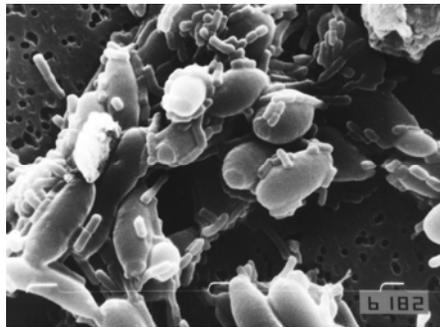
Fig. 2. Mechanisms for intestinal transport of peptides: (1), paracellular; (2), passive diffusion; (3) endocytosis; (4) carrier-mediated transport.

Table 3. Commercial dairy products and ingredients with health or function claims based on bioactive peptides

Brand name	Type of product	Claimed functional bioactive peptides	Health/function claims	Manufacturers
Calpis	Sour milk	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro, derived from β -casein and α -casein	Reduction of blood pressure	Calpis Co., Japan
Evohia	Calcium enriched fermented milk drink	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro, derived from β -casein and α -casein	Reduction of blood pressure	Valio Oy, Finland
BioZate	Hydrolysed whey protein isolate	β -lactoglobulin fragments	Reduction of blood pressure	Davisco, USA
BioPURE-GMP	Whey protein isolate	α -casein f(106-169) (Glycomacropeptide)	Prevention of dental caries, influence the clotting of blood, protection against viruses and bacteria	Davisco, USA
PRODIET F200Lactium	Flavoured milk drink, confectionery, capsules	α_{11} -casein f(91-100) (Tyr-Leu-Gly Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Arg)	Reduction of stress effects	Ingredia, France
Festvo	Fermented low-fat hard cheese	α_{11} -casein f(1-9), α_{11} -casein f(1-7), α_{11} -casein f(1-6)	No health claim as yet	MTT Agrifood Research Finland
Cysteine Peptide	Ingredient/hydrolysate	Milk protein derived peptide	Aids to raise energy level and sleep	DMV International, the Netherlands
C12	Ingredient/hydrolysate	Casein derived peptide	Reduction of blood pressure	DMV International, the Netherlands
Capolic	Ingredient	Caseinophosphopeptide	Helps mineral absorption	Arla Foods Ingredients, Sweden
PeptoPro	Ingredient/hydrolysate	Casein derived peptide	Improves athletic performance and muscle recovery	DSM Food Specialties, the Netherlands
Vivalin Alpha	Ingredient/hydrolysate	Whey derived peptide	Aids relaxation and sleep	Borsculo Domo Ingredients (BDI), the Netherlands

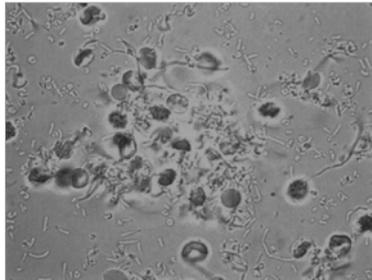
Componentes de la fracción no bacteriana con actividad biológica

- **Exopolisacáridos**
- **Péptidos bioactivos**
- **Proteínas microbianas**



Micrografía electrónica de un ensayo de coagregación de *Lb. kefir* CIDCA 8321 con *S. lipolytica* CIDCA 812. (5000 X)

Hemoaglutinación



Correlación entre

- autoagregación
- coagregación con levaduras
- hemaglutinación.

Superficie
bacteriana

pili
flagelos
cápsula
proteínas de superficie

Interacción hidrofóbica
Interacción electrostática
Interacciones específicas
(lectinas)

Capa S

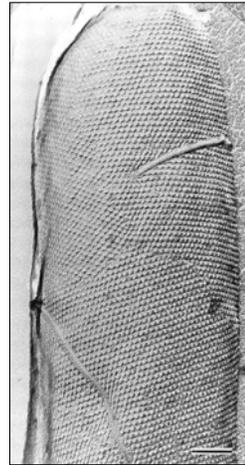
Estructura ampliamente distribuida en bacteria

Arreglo monomolecular cristalino de proteínas

Formado por una a 6 subunidades idénticas

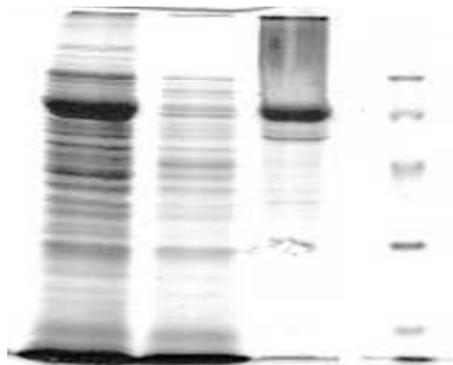
En Gram + la capa S está asociada al peptidoglicano

En Gram - está asociada a la membrana externa (LPS)



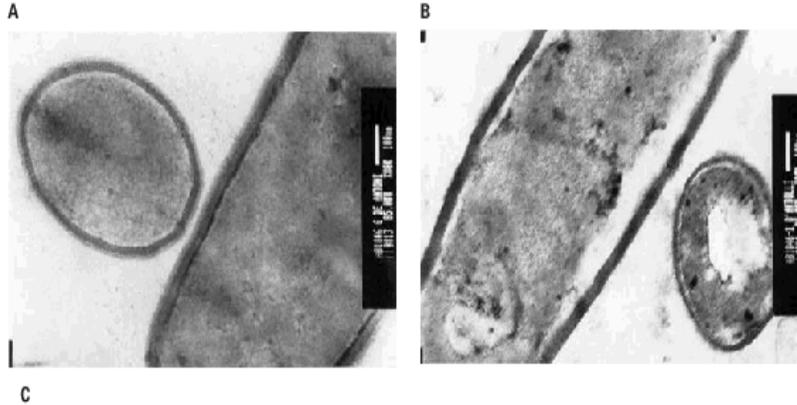
Sára and. Sleytr, J Appl Microbiol 2000

Proteínas de superficie de *Lactobacillus kefir* CIDCA 8321

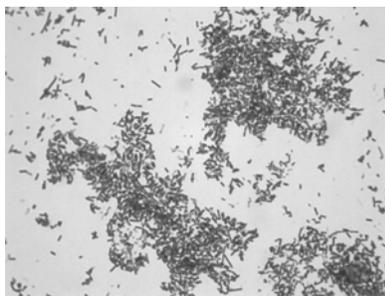


- 1, proteínas solubles totales (trat. con lizosima)
- 2, idem luego de extracción con LiCl 5M
- 3, proteínas extraídas en LiCl (dializado y concentrado con PVP)
- 4, MW

Microscopía electrónica de transmisión



Observación microscópica (100x) de la autoagregación de *Lb. kefir* CIDCA 8321 antes (a) y después (b) del tratamiento con LiCl.

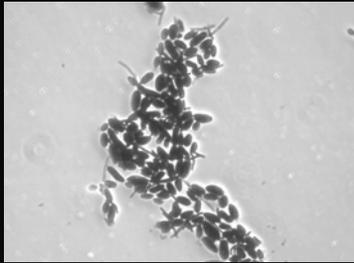


a

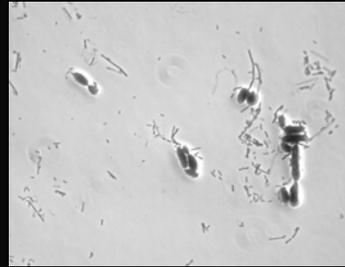


b

Observación microscópica (100x) de la coagregación entre *Lb. kefir* 3321 y *S. lipolytica* CIDCA 312 antes (a) y después (b) del tratamiento con LiCl 5M.

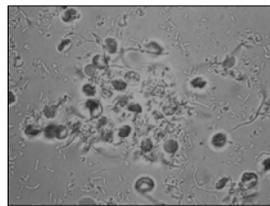


a

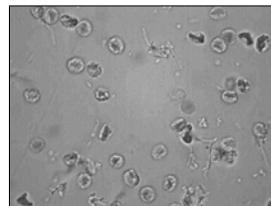


b

Proteínas de superficie de *Lactobacillus kefir* y hemaglutinación



Con capa S



Sin capa S

Lactobacillus kefir

PM de capa S

71	69	66	
8310	83111	83113	83115
8314	JCM 5818	8335	8321
8315			8325
8317			8345
8319			8347
83110			8348
83116			
8326			
8332			
8343			
8344			

Coagregar
con
levaduras

Autoagregar

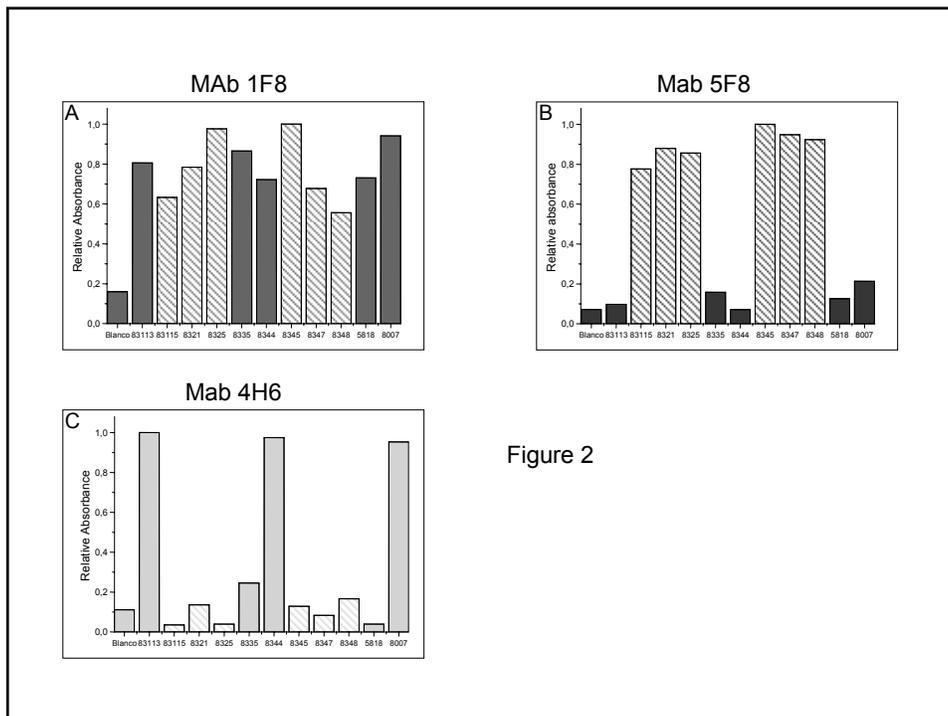


Figure 2

Proteínas de superficie

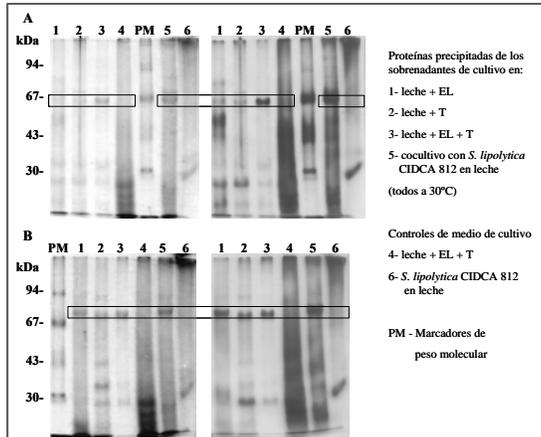


Figura 1.5 Análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas precipitadas con acetona a partir de los sobrenadantes de cultivo libres de células de *L. kefir* CIDCA 8321 (A) y CIDCA 8344 (B) crecidas en leche suplementada con extracto de levadura (EL) y/o triptona (T), o en cocultivo con la levadura *S. lipolytica* CIDCA 812 en leche (ver texto adjunto). También se muestran las proteínas precipitadas a partir de los controles correspondientes a leche suplementada con EL+T y a *S. lipolytica* CIDCA 812 en leche, y los marcadores de peso molecular. El recuadro señala las proteínas de capa-S de cada lactobacilo. Condiciones: acrilamida-bis 12,8%, tinción con Coomassie (izquierda) y Plata (derecha).

Mobili 2008

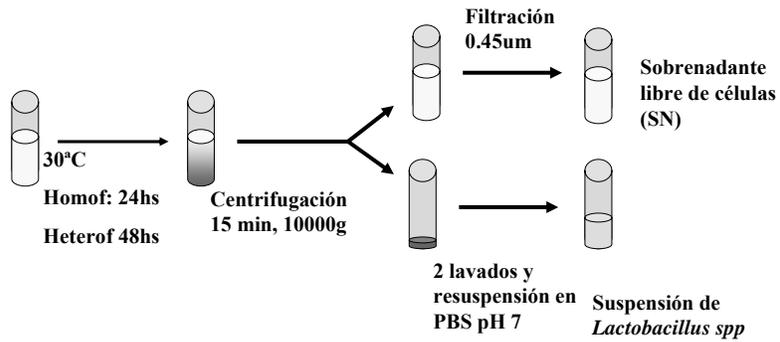
Inhibición de *Salmonella* sp.

*Principales factores de patogenicidad:

- **fimbrias** que podrían ayudar a la adhesión a células intestinales.
- **secreción de proteínas llamado Tipo III** que le permite secretar e inyectar proteínas en el citosol de la célula.

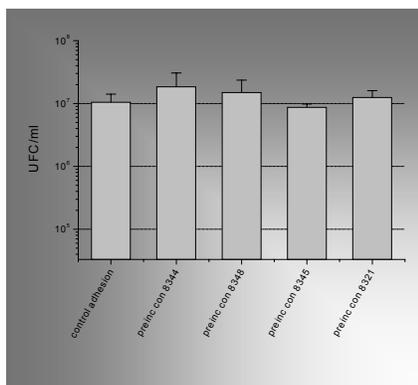
* Cuando la bacteria llega al intestino, las microvellosidades empiezan a degenerarse con elongación, edema y crecimiento en un proceso llamado ruffling (rizado). Se producen cambios morfológicos y rearreglos en el citoesqueleto que causa que las células intestinales internalicen la bacteria.

Protección de lactobacilos contra Salmonella

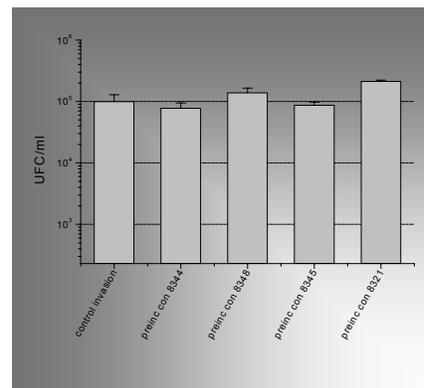


Golowczyc et al 2007

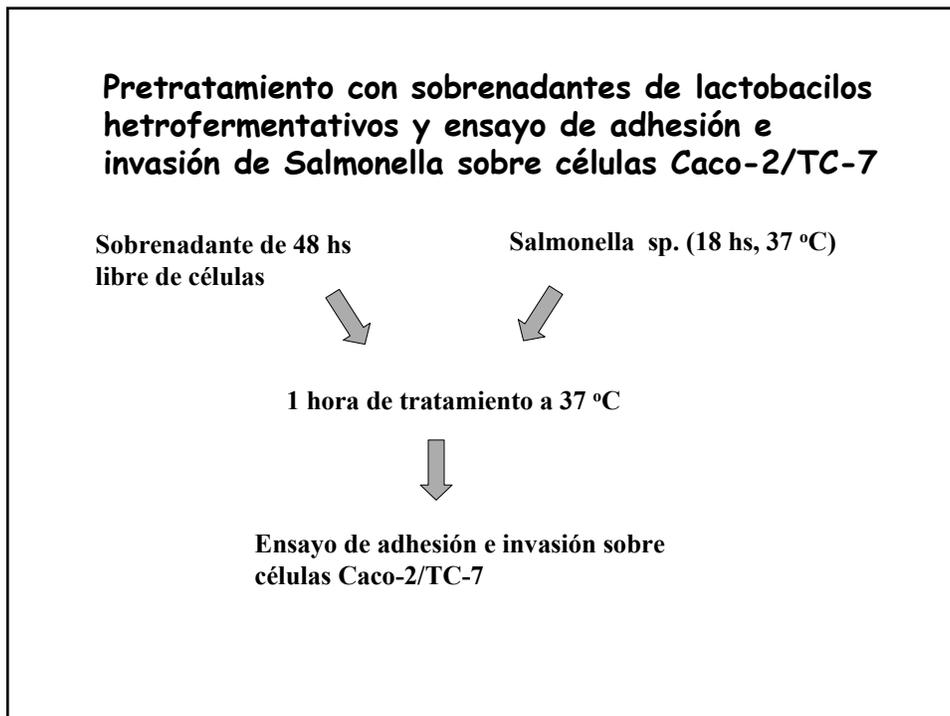
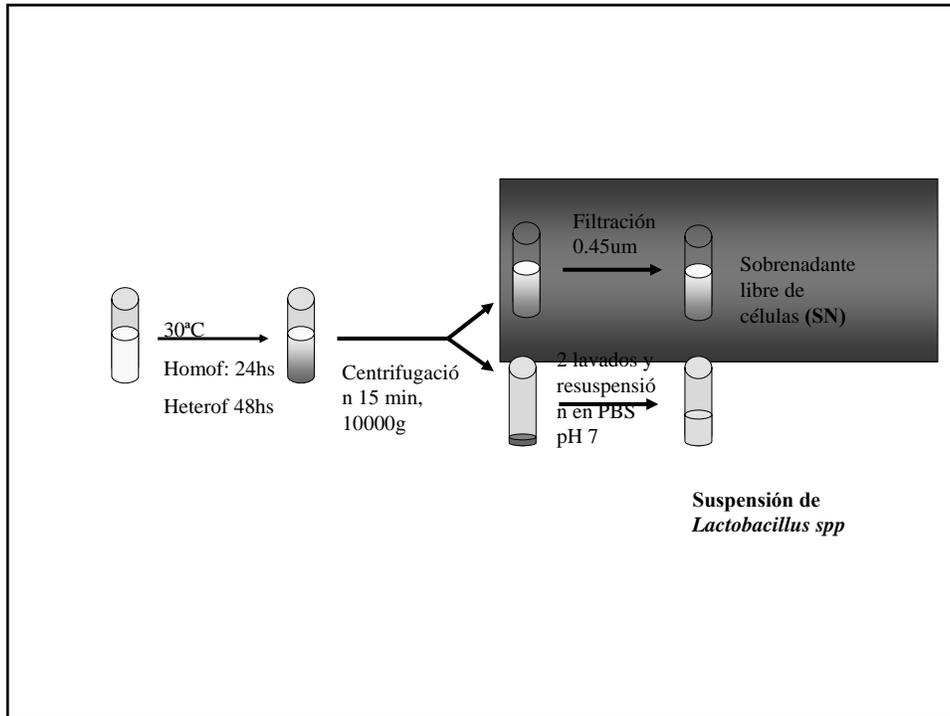
Interacción de *Salmonella sp.* con bacterias aisladas de kefir sobre células intestinales Ensayo de protección Heterofermentativas



Adhesión

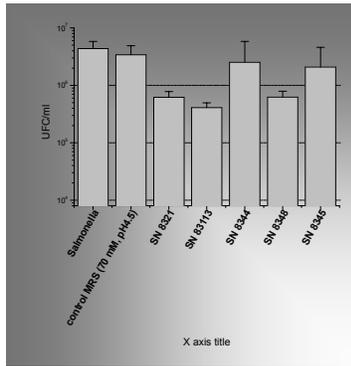


Invasión

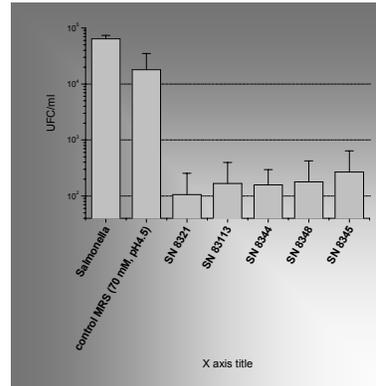


Pretratamiento con sobrenadantes de Lactobacilos heterofermentativos

Adhesión

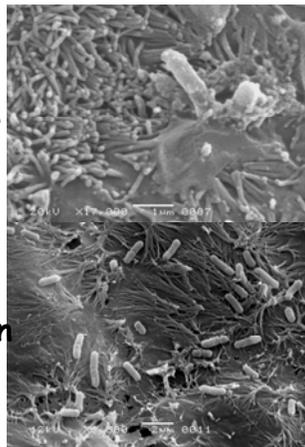


Invasión



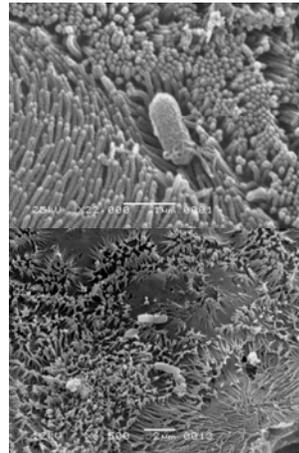
Salmonella sobre caco 2

40min

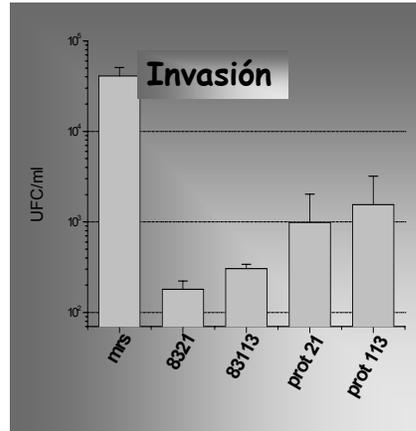
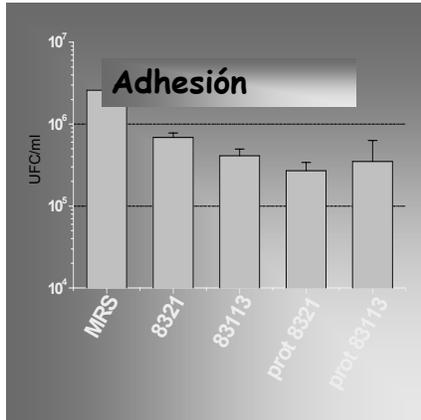


120min

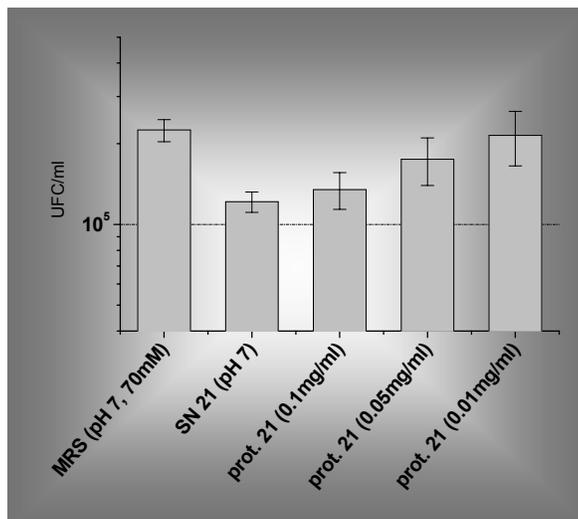
Tratada con sobrenadante



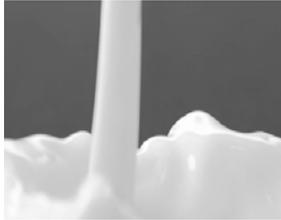
Adhesión e invasión de *Lb. kefir* 8321 y 83113 pretratadas con sobrenadantes de cultivo y con proteína extraída de la superficie con LiCl (concentración aprox. = 0.1 mg/ml)



Invasión de *Salmonella* pretratada con sobrenadante de *Lb. kefir* 8321 y diferentes concentraciones de proteínas extraídas con LiCl

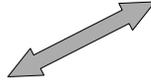


Efecto benéfico de leches fermentadas



Leche
fermentada

Probiótico



Componentes de la fracción no bacteriana con
actividad biológica

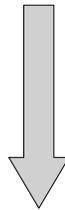
Componentes de la fracción no bacteriana

Ácidos orgánicos
bacteriocinas

Exopolisacáridos

Péptidos

Proteínas microbianas



Actividad benéfica para la salud de las leches
fermentadas