



S.E.P.

S.E.S.

Tec.N.M.

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA

“APROVECHAMIENTO DEL SUERO LÁCTEO PARA LA OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS ANTIHIPERTENSIVOS ENCAPSULADOS EN SISTEMAS POLIMÉRICOS BIODEGRADABLES”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

PRESENTA:

YOLANDA ALVARADO PÉREZ

No. DE CONTROL: 8703D0197

DIRECTORA:

DRA. CLAUDIA ROSARIO MURO URISTA

CO-DIRECTOR:

DR. ALFREDO MACIEL CERDA

METEPEC, ESTADO DE MÉXICO, DICIEMBRE DE 2017

"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

Metepec, Méx., 12/diciembre/2017

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

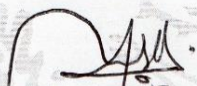
DEPI-395-1939/2017

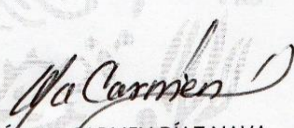
DR. JOSÉ LUIS GARCÍA RIVAS
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PRESENTE.

Por este medio comunicamos a usted que la Comisión Revisora designada para analizar la tesis denominada **"APROVECHAMIENTO DEL SUERO LÁCTEO PARA LA OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS ANTIHIPERTENSIVOS ENCAPSULADOS EN SISTEMAS POLIMÉRICOS BIODEGRADABLES"**, que como parte de los requisitos para obtener el grado académico de Doctor en Ciencias Ambientales presenta la C. YOLANDA ALVARADO PÉREZ, con número de control 8703D0197 para sustentar el acto de Recepción Profesional, ha dictaminado que dicho trabajo reúne las características de contenido y calidad necesarios para proceder a la impresión del mismo.

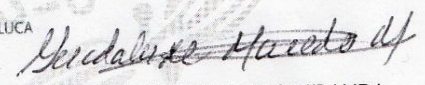
ATENTAMENTE

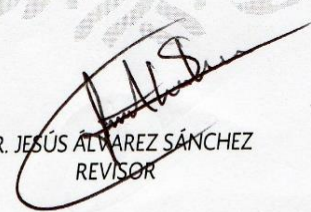

DRA. CLAUDIA ROSARIO MURO URISTA
DIRECTORA DE TESIS


DR. ALFREDO MACIEL CERDA
CO DIRECTOR DE TESIS


DRA. MARÍA DEL CARMEN DÍAZ NAVA
REVISORA


DR. ISAÍAS DE LA ROSA GÓMEZ
REVISOR


DRA. MA. GUADALUPE MACEDO MIRANDA
REVISORA


DR. JESÚS ÁLVAREZ SÁNCHEZ
REVISOR



"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

Metepec, Méx., 15/diciembre/2017

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

DEPI-395-2051/2017

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS

C. YOLANDA ALVARADO PÉREZ
CANDIDATA AL GRADO DE DOCTORA
EN CIENCIAS AMBIENTALES
PRESENTE.

De acuerdo con el Reglamento de Titulación del Sistema Nacional de Educación Superior Tecnológica de la Subsecretaría de Educación Superior de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora realizó con respecto a su Trabajo de Tesis titulado "APROVECHAMIENTO DEL SUERO LÁCTEO PARA LA OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS ANTIHIPERTENSIVOS ENCAPSULADOS EN SISTEMAS POLIMÉRICOS BIODEGRADABLES", la División de Estudios de Posgrado e Investigación concede autorización para que proceda a la impresión del mismo.

Sin más por el momento, quedo de usted.

ATENTAMENTE

Educación, Integridad y Ciencia



DR. JOSÉ LUIS GARCÍA RIVAS
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL
DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

JLGR/magj



Av. Tecnológico S/N, Fraccionamiento La Virgen, C.P. 52149,
Metepec, Estado de México. Tels. Dirección (01722) 208 7205, Subd. Académica 208 7207,
Subd. de Planeación 208 7206, Subd. Administrativa 208 7208, Conmut. 208 72 00
e-mail: info@ittoluca.edu.mx, www.ittoluca.edu.mx



AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a todos los que me ayudaron y apoyaron durante la realización de este trabajo.

En especial a mi directora de tesis la Dra. Claudia Muro por su enseñanza, consejos y sobre todo por ser mi guía para la elaboración de ésta investigación.

A mi comité tutorial por su apoyo en todo momento en la realización y mejora de este trabajo.

A mis compañeros que me permitieron ser parte de su equipo y que me ayudaron incondicionalmente en este proyecto.

Al personal del Instituto Tecnológico de Toluca que gestionó mi permiso para poder realizar esta investigación.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a mis hijos, Guillermo y Alfredo por ser la motivación de mis logros, por su amor, paciencia y comprensión.

A mi esposo Guillermo por su tiempo.

A mis hermanos y hermanas y sus respectivas familias, por su cariño, confianza y amistad

A mis padres porque me enseñaron entereza y perseverancia para conseguir mis metas.

A doña Mari por su apoyo y confianza.

RESUMEN

El suero es un subproducto de la industria del queso que, debido a su contenido proteico y lactosa, puede ser utilizado en diversas aplicaciones. Sin embargo, aún es vertido en muchos lugares como residuo, y por su alto contenido en materia orgánica y principalmente en lactosa, tiene un alto poder contaminante. Para evitar este problema ambiental, actualmente se promueve su venta y aprovechamiento principalmente para la elaboración de productos alimenticios, fármacos y cosméticos.

Particularmente, en últimas décadas se ha descubierto su potencial como fuente de proteínas que al hidrolizarse liberan péptidos con actividades biológicas, los cuales al ser suministrados pueden contribuir al tratamiento y prevención de enfermedades como la hipertensión, obesidad y cáncer.

Un inconveniente para el aprovechamiento de estos hidrolizados o péptidos como sustancias con poder biológico, es que son moléculas sensibles que pierden rápidamente su actividad y al ser administradas por vía oral, en su paso por el tracto gastrointestinal, son degradadas antes de alcanzar el objetivo para el que fueron suministradas. Para superar este obstáculo, se han estudiado diferentes alternativas, entre las que se encuentran el encapsulamiento de las moléculas activas en biopolímeros. A través del encapsulamiento se busca proteger dichas sustancias y utilizar el sistema de encapsulamiento como un medio de liberación de éstas.

Este trabajo tuvo como objetivo la encapsulación de péptidos con propiedad biológica antihipertensiva, identificados por su actividad inhibitoria de la ECA (enzima convertidora de angiotensina), en polímeros biodegradables. Para ello se llevó a cabo las siguientes actividades. 1) Se obtuvo un concentrado de proteínas de suero lácteo de muestras provenientes de la industria de queso, a fin de marcar la posibilidad de su aprovechamiento como materia prima de obtención de péptidos activos. 2) A partir de dicho concentrado se obtuvieron hidrolizados proteicos, mediante la hidrólisis de proteínas lácticas durante 6 h, utilizando biomasa encapsulada de *Bacillus subtilis* como microorganismo proteolítico. 3) Posteriormente, los hidrolizados obtenidos fueron

fraccionados mediante una membrana de nanofiltración para obtener productos de peso molecular alrededor de 3 kDa, y se determinó su contenido y tipo de aminoácidos, así como la actividad de inhibición de la enzima ECA. 4) La fracción de mayor actividad antihipertensiva se encapsuló en tres biopolímeros compuestos, utilizando como matriz alginato de sodio y como fase complementaria se probaron los materiales, colágeno, goma arábiga, y gelatina, cada uno por separado. 5) Para verificar la conservación de la actividad antihipertensiva durante el tiempo mencionado y determinar la liberación de los péptidos, se realizó una simulación gastrointestinal utilizando fluidos, enzimas y pHs gástricos.

Entre los resultados logrados se encuentran la obtención de hidrolizados, cuyas fracciones peptídicas de peso molecular < 3 kDa, mostraron 82.3 % de actividad inhibitoria ECA; probablemente derivada en su mayoría, de proteínas lácticas β -lg y α -la, de acuerdo al resultado de electroforesis. Además la detección de la presencia de los aminoácidos como prolina, valina, leucina, tirosina, isoleucina, arginina, confirmaron la actividad antihipertensiva de las fracciones obtenidas, ya que dichos aminoácidos son identificados como principales precursores de la inhibición de la ECA.

En la simulación gástrica, se encontró que en 4 h de digestión, los encapsulados liberaron péptidos con actividad inhibitoria ECA. La mayor liberación de péptidos fue proporcionada por el encapsulado de alginato-goma arábiga (AG) con 77.3 %, seguido de 73.7 % proveniente de alginato-colágeno (AC), y 70.4 % de alginato-gelatina (AGE).

Los péptidos activos liberados del mismo encapsulado mostraron 80.35 % de actividad inhibitoria ECA con respecto a la actividad de los péptidos libres, lo cual indicó una pérdida del 10 % de actividad. Mientras que en los otros encapsulados se obtuvo una pérdida del 30-50 %. Estos resultados revelaron que el sistema AG mantuvo la mayor actividad de los péptidos del suero lácteo, y resultó el mejor sistema de liberación.

CONTENIDO

	RESUMEN	
	INTRODUCCIÓN	1
1	FUNDAMENTOS	4
1.1	Suero Lácteo	7
1.1.1	Lactosa	9
1.1.2	Proteínas del Suero lácteo	10
1.1.2.1	β -Lactoglobulina	11
1.1.2.2	α -Lactoalbúmina	12
1.1.2.3	Lactoperoxidasa	12
1.1.2.4	Lactoferrina	12
1.1.2.5	Inmunoglobulinas	13
1.1.2.6	Seroalbúmina	13
1.1.2.7	Proteasas-peptonas	14
1.2	Procesos de aislamiento y/o concentración de proteínas del suero de leche	14
1.2.1	Procesos de concentración de proteínas del suero lácteo con membranas	15
1.3	Hidrólisis de proteínas	16
1.3.1	Hidrólisis enzimática	18
1.3.1.1	Hidrólisis con biomasa microbiana	20
1.3.1.2	Inmovilización de biomasa microbiana	22
1.3.1.2.1	Materiales utilizados para inmovilización de biomasa microbiana	23
1.4	Liberación de péptidos por la acción de la hidrólisis de proteínas	27
1.4.1	Propiedades biológicas de los péptidos	28
1.4.1.1	Péptidos antihipertensivos	29
1.5	Encapsulación de péptidos con actividad biológica derivados de las proteínas del suero	31
2	MÉTODO	34
2.1	Caracterización del suero lácteo	35
2.2	Concentración de proteínas del suero lácteo utilizando ultrafiltración	39
2.2.1	Obtención y caracterización del concentrado proteico	39
2.3	Encapsulación de la biomasa de <i>Bacillus subtilis</i>	40
2.3.1	Propagación y preparación de biomasa de <i>B. subtilis</i>	40

2.3.2	Encapsulamiento de <i>B subtilis</i>	41
2.3.3	Caracterización de los sistemas de encapsulación d <i>B. subtilis</i>	42
2.4	Hidrólisis del concentrado de proteínas con biomasa encapsulada <i>B. subtilis</i>	46
2.4.1	Determinación del grado de hidrólisis de los concentrados proteicos	46
2.4.2	Determinación de pesos moleculares de hidrolizados de concentrados proteicos	47
2.4.3	Determinación de ciclos de reúso de encapsulados en la hidrólisis de los concentrados de proteínas	50
2.5	Obtención de fracciones peptídicas activas de hidrolizados por membranas de nanofiltración	50
2.5.1	Determinación del peso molecular de las fracciones peptídicas mediante SDS-PAGE	51
2.5.2	Determinación del perfil de aminoácidos de las fracciones peptídicas mediante HPLC	51
2.6	Determinación de la actividad inhibitoria de la ECA de los productos obtenidos	51
2.7	Encapsulación de las fracciones peptídicas	53
2.7.1	Determinación de las características de los sistemas de encapsulación	53
2.8	Determinación de la capacidad de liberación de péptidos por los sistemas encapsulantes	54
3	RESULTADOS	55
3.1	Caracterización de suero lácteo	55
3.2	Concentración de proteínas del suero lácteo utilizando ultrafiltración	57
3.2.1	Obtención y caracterización del concentrado proteico	57
3.3	Encapsulación de biomasa <i>de B. subtilis</i>	59
3.3.1	Caracterización de los sistemas de encapsulamiento	60
3.4	Hidrólisis del concentrado de proteínas con biomasa bacteriana encapsulada	67
3.4.1	Obtención del grado de hidrólisis de los concentrados de proteínas	67
3.4.2	Obtención de los pesos moleculares de hidrolizados de concentrados proteicos	69
3.4.3	Ciclos de reúso de encapsulados en la hidrólisis de los concentrados proteicos	71
3.5	Obtención de fracciones peptídicas activas de hidrolizados por NF	73

3.5.1	Peso molecular de las fracciones peptídicas mediante SDS-PAGE	74
3.5.2	Perfil de aminoácidos de las fracciones peptídicas mediante HPLC	75
3.6	Actividad inhibitoria de la ECA de las fracciones peptídicas	77
3.7	Encapsulación de fracciones peptídicas	79
3.7.1	Obtención del tamaño de poro de los sistemas de encapsulación de las fracciones peptídicas	80
3.8	Capacidad de liberación de los péptidos por los sistemas encapsulantes	81
3.8.1	Actividad antihipertensiva de los péptidos liberados	84
	CONCLUSIONES	85
	REFERENCIAS	87

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1.1	Composición de suero ácido y de suero dulce	9
Tabla 1.2	Distribución y características de las proteínas de la leche	10
Tabla 1.3	Nitrógeno amino/ nitrógeno total de las especies proteicas	17
Tabla 1.4	Tipos de proteasas, fuente, sitio activo y condiciones en las que actúan	19
Tabla 1.5	Microorganismos más usados comercialmente en la obtención de enzimas proteolíticas y las condiciones de acción de la enzima	21
Tabla 1.6	Algunos péptidos obtenidos de hidrolizados de proteínas del suero de leche con propiedades antihipertensivas	30
Tabla 1.7	Investigaciones sobre la encapsulación de proteínas y péptidos de leche	33
Tabla 2.1	Volúmenes de la solución patrón de albúmina método de Biuret	38
Tabla 2.2	Volumen de los reactivos para la preparación de geles de poliacrilamida, separación y empaquetamiento	47
Tabla 2.3	Preparación de solución buffer de la muestra 4x para proteínas	48
Tabla 2.4	Preparación de los reactivos de tinción y destinción	49
Tabla 3.1	Resultados obtenidos en la caracterización del suero lácteo	56
Tabla 3.2	Resultados reportados de otros autores de las características de suero lácteo	56
Tabla 3.3	Resultados obtenidos de la caracterización del concentrado de proteínas el suero lácteo	57
Tabla 3.4	Resumen de resultados del rendimiento del concentrado de proteínas	58
Tabla 3.5	Características de resistencia mecánica obtenidas para diferentes sistemas de encapsulación	60
Tabla 3.6	Características superficiales de las esferas y del poro	65
Tabla 3.7	Perfil de aminoácidos HP y HC	76
Tabla 3.8	Inhibición de la ECA del hidrolizado y sus fracciones expresado en porcentaje	77
Tabla 3.9	Secuencia de aminoácidos Inhibidores de la ECA	79
Tabla 3.10	Área superficial y tamaño del diámetro de poro de los encapsulados, A, AC, AG y AGE	80
Tabla 3.11	Porcentaje de péptidos liberados por los sistemas de encapsulamiento en A, AC, AG y AGE	81
Tabla 3.12	Porcentaje de la actividad inhibitoria de la ECA de las fracciones peptídicas encapsuladas en A, AC, AG y AGE bajo condiciones gastrointestinales durante 4 h	83

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1.1	Estructura química de alginato de sodio y su unión con iones calcio	24
Figura 1.2	Estructura química del quitosano	25
Figura 1.3	Estructuras químicas del glutaraldehído y del PEG	26
Figura 2.1	Diagrama con las etapas de la investigación	34
Figura 2.2	Caja Petri con <i>Bacillus subtilis</i>	40
Figura 2.3	Biomasa suspendida de <i>B. subtilis</i>	41
Figura 2.4	a)Muestras, b) equipo para el análisis de FT-IR, c) porta muestras d) espectro de transmisión por FT-IR.	43
Figura 2.5	Microscopio electrónico de barrido	44
Figura 2.6	a)Sortómetro BELSORP-max, b) posición de las celdas en el sortómetro y gráficas de adsorción y desorción de nitrógeno mostradas por el equipo	45
Figura 2.7	Hidrólisis del suero utilizando <i>B. subtilis</i>	46
Figura 2.8	a) Muestras, b) equipo de electroforesis, c) corrimiento de las proteínas y tinción	49
Figura 3.1	Suero lácteo	55
Figura 3.2	Esferas obtenidas utilizando diferentes matrices 1) AAg, 2) ASC, 3) QS, 4) AQ, 5) AQR, 6) AQC, 7) AQG, 8) AQPEG, 9) AQS, 10) AQP, 11) AQA, 12) AQT	59
Figura 3.3	Espectroscopia comparada del FT-IR de las diferentes formulaciones con mezcla física de los sistemas de encapsulación.	62
Figura 3.4	Micrografías obtenidas en el SEM con ampliaciones por columna de 50X, 500X y 2000X de izquierda a derecha. Por renglón las matrices formadas de (ASC), (AQR), (AQC),	63
Figura 3.5	Micrografías obtenidas en el SEM con ampliaciones por columna de 50X, 500X y 2000X de izquierda a derecha. Por renglón las matrices formadas de (AQG), (AQPEG), (AQS).	64
Figura 3.6	<i>B. subtilis</i> inmovilizado en matriz de AQPEG	67
Figura 3.7	Grado de hidrólisis del concentrado del suero lácteo utilizando <i>B. subtilis</i> libre (BL) y encapsulado (BE)	68
Figura 3.8	SDS-PAGE. Efectos de los hidrolizados del concentrado de proteínas utilizando para su obtención <i>B. subtilis</i> libre en y <i>B. subtilis</i> encapsulado en matrices de AQPEG	70
Figura 3.9	Grado de hidrólisis utilizando <i>Bacillus subtilis</i> encapsulada en AQPEG	72
Figura 3.10	Matriz de encapsulación del <i>Bacillus subtilis</i> al término 5 ciclos de hidrólisis en AQPEG	73
Figura 3.11	Concentrado y permeado, fracciones del hidrolizado	74

Figura 3.12	SDS –PAGE del hidrolizado (H) y sus fracciones, concentrado (HC) y permeado (HP)	75
Figura 3.13	Esferas obtenidas para la encapsulación de fracciones peptídicas activas utilizando diferentes matrices de encapsulación A, AC, AG y AGE	80
Figura 3.14	Encapsulados de fracciones peptidicas con A, AC, AG Y AGE al termino de la simulacion gastro intestinal	82

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, la industria láctea es uno de los sectores más importantes de la economía de países industrializados y en desarrollo. En especial, el queso es uno de los productos que más se comercializa a nivel mundial.

Con la producción de queso también se producen grandes cantidades de suero lácteo 9 kg de suero por 1 kg de queso con alto contenido nutricional, (lactosa, proteínas séricas, lípidos, vitaminas y minerales). Sin embargo, a pesar de que este producto es una sustancia valiosa para la elaboración de concentrados, suplementos alimenticios, extracción de lactosa y producción de ácido láctico entre otras, aún muchas empresas lo consideran como residuo y por tanto, se encuentra formando parte de aguas residuales industriales. En situaciones drásticas, también es vertido al suelo o cuerpos de agua causando una alta contaminación.

Derivado de esta situación, se ha promovido su aprovechamiento a fin de disminuir dicho problema, y del cual han emanado diferentes vertientes de investigación. Entre las que se encuentran, estudios sobre el uso de las proteínas del suero lácteo como fuente de péptidos con actividad biológica, debido a que mediante su hidrólisis es posible obtener productos activos antihipertensivos, antioxidantes, antitrombóticos e inmunomoduladores, entre otros, lo cual significa un aporte de gran interés para el sector alimentario, farmacéutico y cosmético.

A lo largo del tiempo, los estudios sobre este tema han sido variados, y se han resuelto diferentes problemas para su aplicación; también han surgido otros problemas que actualmente ocupan la investigación en diferentes perspectivas.

Una vertiente es la investigación referente a las limitaciones que muestran los péptidos como agentes terapéuticos, es su inestabilidad fisicoquímica, el gran tamaño de las biomoléculas, corto tiempo de vida media en el organismo, y su aplicación como biomoléculas terapéuticas; ya que en su administración vía oral, son degradadas en el tracto gastrointestinal, antes de alcanzar el objetivo para el que fueron suministradas.

En respuesta a este problema, se ha sugerido la encapsulación de péptidos como una alternativa para controlar su entrega espacial y temporal en el cuerpo humano y protegerlos contra procesos de inactivación. Sin embargo, aún son pocas las investigaciones realizadas en esta línea.

Bajo lo expuesto anteriormente, el trabajo de tesis que aquí se expone, tuvo como objetivo evaluar el encapsulamiento de péptidos antihipertensivos de suero lácteo en sistemas poliméricos compuestos, para determinar su capacidad de conservación de la actividad y como medios de liberación. Los objetivos específicos fueron los siguientes.

- I. Obtener un concentrado proteico a partir de suero lácteo proveniente de una industria de elaboración de queso, para utilizarse como materia prima en la obtención de péptidos con actividad antihipertensiva.
- II. Obtener hidrolizados activos a partir de concentrados proteicos de suero lácteo utilizando un microorganismo proteolítico encapsulado, a fin de mejorar el proceso enzimático de hidrólisis para liberar péptidos antihipertensivos.
- III. Separar y fraccionar los hidrolizados mediante una membrana para obtener dos tipos de productos de peso molecular definido, con grupos de aminoácidos activos y propiedades antihipertensivas.
- IV. Identificar los grupos de aminoácidos mediante HPLC y determinar su porcentaje de actividad antihipertensiva
- V. Encapsular los productos de mayor actividad antihipertensiva en biopolímeros compuestos para conservar su actividad y utilizarse como medio de liberación de péptidos activos.
- VI. Simular condiciones gastrointestinales para determinar la efectividad del encapsulamiento de los productos antihipertensivos

Como hipótesis se estableció, que el encapsulamiento de péptidos antihipertensivos derivados del suero lácteo en biopolímeros compuestos, es una alternativa útil para mantener su actividad y como medio de liberación.

Para establecer la validez de la hipótesis planteada, la investigación se llevó a cabo experimentalmente en base a los objetivos específicos indicados, obteniéndose en cada caso, los resultados correspondientes.

El trabajo de tesis, se presenta mediante tres apartados. 1) Los fundamentos que implican los conceptos que enmarcan el desarrollo de la investigación; incluyendo el estado del arte, inmerso en cada uno de los tópicos que se abordan. 2) La metodología que describe a detalle la investigación experimental realizada y 3) Los resultados obtenidos, su análisis y conclusiones.

1 FUNDAMENTOS

En diversos procesos de elaboración de productos lácteos se tiene como subproducto el suero de la leche, el cual se obtiene por la precipitación de la caseína. Este subproducto representa, aproximadamente, un 85-95 % del volumen de materia prima utilizada en la producción quesera y retiene un 55 % de los nutrientes de la leche, entre los que destacan como componentes principales, la lactosa y la fracción proteica formada por las proteínas y péptidos lácteos más hidrofílicos, por lo que el suero lácteo es calificado de alto valor nutricional. Sin embargo, aún con esas características, este producto es identificado como un residuo en pequeñas industrias y empresas rústicas elaboradoras de queso, por tanto constituye parte de las aguas residuales y, en condiciones drásticas, sobre todo en zonas rurales, es vertido sin piedad al suelo o cuerpos de agua. Mientras que, en las grandes empresas solo el 50 % es aprovechado como suero seco y la cantidad restante es considerada residuo, por tanto, tiene el mismo destino que lo ya descrito, causando una alta contaminación en suelo y agua. Su alto contenido en materia orgánica y principalmente en lactosa, causan una $DBO > 35000 \text{ mgL}^{-1}$ y $DQO > 60000 \text{ mgL}^{-1}$) en agua, lo cual dificulta su tratamiento y encarece el proceso.

Lo anterior, ha promovido mayor aplicación y aprovechamiento del suero lácteo y sus componentes. Uno de ellos son las proteínas, también llamadas proteínas séricas o lácteas, ya que estas proteínas poseen un alto índice de valor biológico en comparación con otras fuentes de proteína como las del huevo, carne bovina y soya.

Dada su composición las proteínas lácteas representan una excelente fuente de oligopéptidos, péptidos y aminoácidos con diferentes propiedades nutricionales (aminoácidos esenciales), propiedades funcionales (de hidratación, espumante, gelificante, emulsionante), así como, propiedades biológicas (antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica, antihipertensiva). Además, el suero lácteo contiene elementos minoritarios como, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales, que lo hacen aún más rico en nutrientes.

En la actualidad existen en el mercado diferentes productos de suero seco o concentrado de proteínas que proporcionan beneficios específicos para la salud. Además, por su alto valor nutricional son utilizados como sustitutos de alimentos y/o como una gran fuente proteica para atletas, personas que tienen un gran desgaste físico o requieren de un alto rendimiento (Muro *et al.*, 2013). Sin embargo recientemente, gran parte del interés científico en el suero se ha enfocado en encontrar hidrolizados y/o péptidos que contribuyan en el tratamiento y prevención de enfermedades degenerativas, enfermedades ocasionadas por virus y bacterias. Los hidrolizados son obtenidos a partir de una proteína o un conjunto de éstas, mediante procesos enzimáticos o químicos, el cual produce rompimiento de las moléculas proteicas para formar grupos o secuencia de aminoácidos llamados péptidos, los cuales son característicos de la proteína precursora (Muro *et al.*, 2011). Los péptidos heredan y/o mejoran las propiedades funcionales de las proteínas. Dependiendo del grupo de aminoácidos que los conforman, se obtienen péptidos con diferente actividad biológica (Pihlanto-Leppälä, 2001; Florisa *et al.*, 2003; Meisel, 2005; Hartmann y Meisel, 2007).

Entre los efectos conocidos que se han atribuido a los péptidos séricos, se encuentran las propiedades antimicrobianas, antioxidante, antitrombótica, antihipertensiva e inmunomodulatoria, entre otras (Gill *et al.*, 2000; FitzGerald *et al.*, 2004; Virtanen *et al.*, 2007; Muro *et al.*, 2011).

Los péptidos con secuencias específicas son aislados de los hidrolizados mediante separaciones finas, de tal forma que el estudio de la producción, separación y caracterización de estos hidrolizados de proteínas es altamente prometedor en el área de los alimentos funcionales y como moléculas terapéuticas. Por esta situación se genera un interés centrado en la identificación y caracterización de los componentes biológicamente activos.

La actividad de los péptidos se basa en la composición y secuencia de aminoácidos. El tamaño de las secuencias activas puede variar de 2 a 20 residuos de aminoácidos y muchos de ellos se han detectado con funciones biológicas múltiples (Erdmann *et al.*, 2008).

La actividad biológica de los péptidos depende de la composición del suero, del proceso de hidrólisis y del proceso de separación de los péptidos, por lo que, a pesar de que existen varias investigaciones sobre el tema, tan solo la calidad del suero o proceso de elaboración del queso marca la diferencia en la obtención de distintos grupos de aminoácidos.

El proceso que se sigue para aislar las proteínas del suero y para la obtención de los péptidos también es una variable que determina la actividad de los mismos. Los métodos tradicionales para la concentración de proteínas de suero lácteo, como la precipitación por cambio de pH o temperatura afectan el rendimiento del proceso, las propiedades nutricionales de los productos y su actividad biológica por la desnaturalización de las proteínas. El proceso de hidrólisis también influye en los resultados obtenidos sobre la secuencia peptídica y su actividad (Tovar *et al.*, 2012).

No obstante, del avance científico que se tiene en la producción de péptidos de origen lácteo, el desafío tecnológico actual radica en encontrar el método de enriquecimiento más efectivo para aislar péptidos específicos de la mezcla peptídica total, así como la conservación de su estabilidad. Teniendo en cuenta que los péptidos funcionales están presentes en mezclas complejas que contienen un gran número de fracciones de proteínas hidrolizadas, su separación y purificación es tema prioritario (Muro *et al.*, 2013).

Estabilizar y mantener la actividad de los péptidos es otro tema importante, ya que al ser biomoléculas tienen un gran tamaño y presentan inestabilidad y pérdida temprana de su actividad. Además, un problema que se presenta con la administración oral de este tipo de sustancias naturales es su rápida degradación en el tracto gastrointestinal y baja biodisponibilidad, llegando al objetivo de acción con nula actividad. Este hecho, identifica a las biomoléculas como sustancias de gran sensibilidad (Muro *et al.*, 2014; Alvarado *et al.*, 2016).

Una alternativa que ha sido estudiada en la última década para proteger la actividad de moléculas sensibles, es la encapsulación. Ésta ha sido estudiada como medio de protección y liberación de sustancias activas de algunas proteínas, vitaminas,

enzimas, probióticos y prebióticos en el campo de la alimentación, y como moléculas terapéuticas en la industria de fármacos de moléculas terapéuticas como la penicilina, hormonas y vacunas (Alvarado *et al.*, 2016).

Sobre este tema, se han reportado múltiples e interesantes investigaciones que demuestran la eficiencia de la encapsulación para proteger dichas moléculas de las condiciones de producción, del medio ambiente o de su propia ingesta. Sin embargo son pocos los trabajos que están referidos a la encapsulación de péptidos o hidrolizados de proteínas de suero lácteo. Al respecto, Muro *et al.* (2014), ha sugerido, un mayor esfuerzo en la investigación en esta línea, a fin de incrementar las investigaciones que ayuden a mejorar las condiciones de administración de los péptidos activos de suero lácteo como moléculas terapéuticas.

En este sentido, este trabajo pretende aportar conocimiento dando a conocer los resultados sobre el comportamiento obtenido de la encapsulación de péptidos antihipertensivos del suero lácteo en biopolímeros, bajo condiciones de simulación gástrica, a fin de definir sus propiedades de protección y sistema de liberación de los péptidos activos.

1.1 Suero Lácteo

El suero lácteo o lactosuero proviene de la leche, se obtiene de los procesos en los que la leche es sometida a una hidrólisis para precipitar la caseína, que deja como remanente el suero; por tanto, éste se define como la fracción de la leche que no precipita durante dicho proceso.

De esta manera, el suero lácteo es propiamente un residuo de la elaboración de queso, por lo que su obtención se asocia a este sector industrial, el cual ha ido en aumento a nivel mundial, ya que es un producto de alto consumo tanto en países desarrollados, como en aquellos que no lo son.

Tan solo, información del año 2008, indica que la generación de suero ascendió a 186 millones de toneladas, mostrando un crecimiento del orden del 2 % entre 2002 y 2008 debido al alto consumo de queso (Cruz *et al.*, 2008).

A la fecha, debido a que el suero lácteo tiene gran riqueza alimenticia, puede ser utilizado como materia prima para múltiples aplicaciones, en función de su calidad nutricional. Sin embargo, una mínima cantidad es aprovechada y, por tanto en muchas empresas, principalmente en las pequeñas, o aquellas que producen el queso a nivel artesanal, el suero continúa considerándose como residuo y es vertido como efluente en las aguas residuales.

El suero lácteo se compone principalmente de lactosa, proteínas séricas y minerales; su contenido depende principalmente del proceso de elaboración del queso (métodos térmicos, preconcentración y recuperación de los finos de caseína, entre otros) y de la composición química de la leche de la que proviene (Sanmartín, 2010), que, a su vez depende del tipo de animal (bovino, caprino y ovino), raza, estado fisiológico, tipo de alimentación del rebaño y etapa de la lactación promedio.

Pese a las diferencias mencionadas, existe información sobre la composición aproximada del lactosuero, tales como, de 93.1 % de agua, 4.9 % de lactosa, 0.9 % de proteína cruda, 0.6 % de cenizas (minerales), 0.3 % de grasa, 0.2 % de ácido láctico y vitaminas hidrosolubles (Valencia y Ramírez, 2009). Sin embargo, la composición del suero puede cambiar según el proceso de elaboración del queso y da origen a dos tipos de suero; dulce y ácido. El suero ácido, de pH 5 o menor, que se genera luego de la fermentación o agregado de ácidos orgánicos o minerales, y el suero dulce, de pH entre 6 y 7, que se obtiene de la acción de enzimas coagulantes (Hernández y Vélez, 2014). Cada especie bovina, caprina, ovina, búfala, camella, produce suero con sus propias características en cuanto a concentraciones de proteínas, lactosa y minerales.

De acuerdo Panesar *et al.*, (2007), la composición de suero dulce y ácido de origen bovino, varía según los datos mostrados en la tabla 1.1, donde se observa que dicha

variación es encontrada ligeramente en el contenido proteico, siendo mayor en suero dulce, seguido de la cantidad de calcio, fosfatos y lactatos, que en este caso son mayores en suero ácido.

Tabla 1.1. Composición de suero ácido y de suero dulce (Panesar *et al.*, 2007)

Componentes	Suero dulce (g/L)	Suero ácido (g/L)
Sólidos totales	63.0-70.0	63.0-70.0
Lactosa	46.0-52.0	44.0-46.0
Proteínas	6.0-10.0	6.0-8.0
Calcio	0.4-0.6	1.2-1.6
Fosfatos	1.0-3.0	2.0-4.5
Lactatos	2.0	6.4
Cloruros	1.1	1.1

1.1.1 Lactosa

La lactosa o azúcar de la leche es el único glúcido libre que existe en cantidades importantes en todas las leches. De los componentes de la leche es el más abundante (40 % de los sólidos de la leche de origen bovino).

La lactosa se sintetiza en la mama a partir de la glucosa sanguínea y en los rumiantes, a partir de ácidos volátiles. Éste factor limita la producción de leche. Para los seres humanos y para numerosos animales, la lactosa es prácticamente la única fuente de galactosa.

La lactosa es un disacárido formado por la unión de una molécula de glucosa y otra de galactosa. Concretamente interviene una β -D-galactopiranosil y una β -D-glucopiranosil, unidas por los carbonos 1 y 4 respectivamente. Al formarse el enlace entre los dos monosacáridos se desprende una molécula de agua. Además, este compuesto posee el hidroxilo hemiacetalico, por lo que da la reacción de Benedict, es decir es un azúcar reductor.

La lactosa es conocida químicamente como (β -D-galactopiranosil-D-glucopiranos), es una hexobiosa de fórmula condensada $C_{12} H_{22} O_{11}$, con un peso molecular de 342 g/gmol. Existe como dos formas isómeras: α y β , que se diferencian únicamente en la posición de un grupo $-OH$ en el carbono C_1 de la glucosa (isomería ciclónica) que está en posición β . Además, se conoce la forma hidratada ($\alpha C_{12} H_{22} O_{11} \cdot H_2O$).

La lactosa es menos dulce y soluble que la sacarosa y no siempre puede ser absorbida por el sistema digestivo humano, ya que se requiere de enzimas lactasas para su óptima degradación; por lo que su consumo es restringido, a menos que sea degradada a galactosa y glucosa.

1.1.2 Proteínas del suero lácteo

La leche es un alimento completo debido a la alta calidad de sus proteínas. Badui, (2006), las divide en dos grandes grupos, debido a su estado de dispersión: las caseínas que representan el 80 % del total y las proteínas del suero o seroproteínas con el 20 % restante, las cuales se distribuyen como se muestra en la tabla 1.2.

Tabla 1.2. Distribución y características de las proteínas de la leche (Badui, 2006)

Proteínas de la leche	Total de Proteínas (%)	Peso Molecular (kDa)	Número de aminoácidos	Punto isoeléctrico
Caseínas	80			
α_{s1} -CN	34	23.615	199	4.1
α_{s2} -CN	8	25.226	207	
β -CN	25	24.023	209	4.5
κ -CN	9	19.037	169	4.1
Γ -CN	4	19.006		5.8
Proteínas del suero	20			
β -lactoglobulina	9	18-20	162	5.3
α -lactoalbúmina	4	14.2	123	5.1
Inmunoglobulinas	2	140	500>	4.5-8.3
Seroalbúmina	1	69	582	4.7
Lactoferrina		76.11	682	8.81
Proteasa peptona	4	10<		

Al respecto, se considera que cerca del 70 % de la proteína cruda que se encuentra en el suero corresponde a proteínas con un valor nutritivo superior al de la caseína.

Las proteínas del suero lácteo bovino representan el 20 % de las proteínas de la leche, se definen como aquellas que se mantienen en solución tras precipitar las caseínas a un pH de 4.6 a 20 °C. Estas proteínas son compactas y globulares; su peso molecular varía de 14 a 1000 kilo Dalton (kDa) y son solubles en un intervalo de pH amplio incluso pH ácidos (Badui 2006; Acevedo 2010).

Las proteínas mayoritarias en el suero son β -Lactoglobulina, α -Lactoalbúmina, además contiene una serie de proteínas en menor cantidad como la lactoperoxidasa, la lactoferrina, las inmunoglobulinas y la seroalbumina. Otros componentes como la proteasa-peptona y las enzimas nativas también han sido identificadas en el suero (Valencia y Ramírez, 2009). Las proteínas lácteas tienen 20 clases de aminoácidos diferentes, los cuales se unen por medio de un enlace covalente para formar un enlace amida entre los grupos α -amino y α -carboxilo. Este enlace suele llamarse enlace peptídico y la reacción que se presenta de esta unión es la formación de una amida mediante la pérdida de una molécula de agua, los productos formados a partir de esta unión se llaman péptidos. A continuación, se describen las principales proteínas del suero lácteo

1.1.2.1 β -Lactoglobulina

La β -Lactoglobulina (β -Lg), con una masa molecular promedio de 18-20 kDa (Tovar *et al.*, 2012). La secuencia de aminoácidos de la β -Lg consta de 162 residuos de aminoácidos y una pI (Punto Isoeléctrico) de 5.1 a un pH neutro y temperatura ambiente (Acevedo, 2010). La β -Lg es Insoluble en agua destilada, soluble en soluciones diluidas de sal, precipitable por altas temperaturas y por la acción de soluciones al 50 % de sulfato de magnesio o de amonio; representa aproximadamente el 45 % de las proteínas totales del suero.

No se encuentra en la leche materna y se les atribuye las reacciones alérgicas a los infantes alimentados con leche de vaca (Acevedo, 2010).

1.1.2.2 α -Lactoalbúmina

La α -Lactoalbúmina (α -La) es, por orden de importancia, la segunda proteína del suero y tiene una actividad biológica ya que está constituida del sistema enzimático requerido para la síntesis de la lactosa. Es la proteína láctea de mayor poder alergénico, tiene 123 aminoácidos con una masa molecular de 14.2 kDa, su pI esta entre 4.2-4.5. Entre sus características se cuenta su bajo peso molecular y su alto contenido de triptófano, mientras que es pobre en fenilalanina, en tirosina y en cisteína (Brines *et al.*, 1997; Acevedo, 2010).

1.1.2.3 Lactoperoxidasa

La lactoperoxidasa es una enzima del suero que ha sido cristalizada y purificada. Constituye un ejemplo de obtención bioquímica laboriosa y de muy bajo rendimiento, con 100 litros de leche se obtienen 0.2 g de enzima cristalizada. La leche contiene 0.07 g de lactoperoxidasa por litro lo que significa el 0.2 % del total del contenido proteico. Resiste bien el calentamiento pues es preciso mantener 70 °C por 15 minutos o 80 °C por 30 segundos para poder destruirla. Su actividad biológica es interesante en la ciencia lechera ya que es un inhibidora de algunas bacterias lácticas (Alais, 1985).

1.1.2.4 Lactoferrina

La lactoferrina (Lf) es una proteína con un peso molecular de 88 kDa y tiene gran solubilidad. La presencia de hierro en la molécula la hace más resistente a los

procesos desnaturalizantes (tratamiento térmico y sustancias químicas) y a las enzimas proteolíticas. Su actividad bacteriostática ha sido probada, ya que posee “bactereostasa ferriptiva” que actúa sobre los gérmenes infecciosos peligrosos para los lactantes. La leche de vaca contiene aproximadamente 0.1 g/L de esta proteína (Alais, 1985).

1.1.2.5 Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas (Ig) son proteínas que se caracterizan porque son de las moléculas más grandes que se encuentran en la leche. Dentro de las inmunoglobulinas se encuentran las IgG, IgA, IgM. Son las primeras en desnaturalizarse con el calentamiento de la leche y representan un papel fundamental en la transferencia de anticuerpos de la madre al ternero recién nacido (Alais, 1985). Las IgG constan de dos cadenas ligeras de 20 kD y dos cadenas pesadas de 50 kD y pueden resistir la digestión gástrica, la IgA y la IgM son similares a la IgG y se ha demostrado que aglutinan bacterias, neutralizan toxinas e inactivan virus (Gil, 2010).

1.1.2.6 Seroalbúmina

La seroalbúmina cuenta con 582 aminoácidos, con una masa molecular de 66 kDa (Garrido *et al.*, 2006) y presenta la cadena más larga de péptidos simple de las proteínas del suero y, enlazada con moléculas de ácido graso, actúa como una proteína transportadora de ácidos grasos insolubles en el sistema circulatorio de la sangre.

1.1.2.7 Proteasas-peptonas

Son péptidos que provienen de la hidrólisis de la β -caseína. Constituyen una fracción heterogénea que todavía no está muy bien definida. Poseen un peso molecular inferior a los 10 kDa. Se les ha definido como una fracción de las proteínas de la leche que no precipita por calentamiento a 95 °C por 30 minutos, seguida de una acidificación de 4.6. Son importantes en la industria quesera porque su presencia se atribuye a sabores amargos (Gil, 2010).

1.2 Procesos de aislamiento y/o concentración de las proteínas del suero de leche

Las proteínas del suero lácteo se aíslan de los demás componentes, principalmente de la lactosa, por medio del uso de distintas técnicas como son, precipitación, formación de complejos, liofilización, cromatografía y concentración con membranas.

En un importante estudio reportado por Tovar *et al.*, (2012), se evaluaron seis métodos de separación para la concentración de proteína de suero lácteo. Se compararon la composición nutricional y las actividades biológicas de los concentrados proteicos obtenidos por cada método. Los tratamientos de separación fueron por adición de sal, precipitación con acetona, precipitación con HCl, precipitación térmica, liofilización y concentración por procesos de membrana. El mejor resultado fue el obtenido por este último proceso de separación, ya que se obtuvo un valor de 35.44 g de proteínas/100 g de polvo. La liofilización fue el segundo método más eficiente en este estudio, el cual proporcionó 12.04 ± 0.2 g de proteínas/100 g de polvo, mientras que los restantes dieron muestra de la degradación que sufren las proteínas durante su aislamiento. Los resultados de electroforesis y solubilidad de las proteínas revelaron que el método de UF ofrece la ventaja de mantener las proteínas en su estado nativo.

Actualmente, los procesos de UF se usan en aplicaciones a gran escala, mientras que la cromatografía se utiliza para pequeñas muestras de suero. Sin embargo, algunas veces por economía, se utiliza la desnaturalización por calor, aun cuando algunas proteínas son degradadas, presentándose pérdida en la capacidad biológica de dichos aislados (Gösta, 2003; Tovar *et al.*, 2012).

1.2.1 Procesos de concentración de proteínas del suero lácteo con membranas

Los procesos de separación de membranas se aprovechan para concentrar o fraccionar un líquido, que se hace pasar a través de una membrana semipermeable, tras crear un gradiente que actúa como la fuerza impulsora y separa el fluido con partículas en dos corrientes de diferente composición: el retenido o concentrado y el permeado o filtrado (Lewis, 2008).

Cuando la fuerza que impulsa a los componentes que atraviesan la membrana, es la presión, se distinguen cuatro tipos de procesos, microfiltración (MF) la UF, nanofiltración (NF) y osmosis inversa (OI).

La UF separa eficazmente macromoléculas como las proteínas y partículas como micelas de las proteínas y glóbulos de grasa, para dar concentrados proteicos de lactosuero (Gil, 2010). Para un concentrado de 85 % de proteína se recomienda llevar a cabo una UF en promedio de 20-30 veces, hasta un contenido de sólidos aproximadamente del 25 % (Gösta, 2003; Gil, 2010; Tovar *et al.*, 2012).

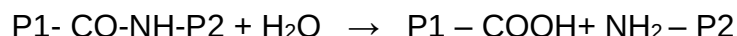
Según Selgas (1990), el concentrado proteico es un producto obtenido por la remoción de los constituyentes no proteicos del suero después de haber sido sometido a procesos de clarificación y ultrafiltración. Así, el proceso de UF consiste en separar los componentes de alto peso molecular (proteínas), de los compuestos de bajo peso molecular (sales minerales, vitaminas, carbohidratos y agua).

1.3 Hidrólisis de proteínas

La hidrólisis de proteínas es un proceso en el cual se produce la ruptura de la estructura primaria. Es decir, la hidrólisis rompe la secuencia normal de una proteína, para convertirlas en aminoácidos. La fragmentación de proteínas se puede controlar, por tanto, puede ser parcial o total, lo cual permite la liberación de aminoácidos o grupos de éstos y da origen a mezclas de diferente peso molecular e hidrolizados enriquecidos en aminoácidos que pueden tener actividad biológica y funcional (Muro *et al.*, 2011).

Básicamente existen dos métodos para llevar a cabo la hidrólisis: química (ácida o alcalina) y enzimática a través de proteasas puras o microorganismos que las producen.

Independientemente del método utilizado, en la hidrólisis se rompe el enlace existente entre los aminoácidos que componen una cadena peptídica, consumiéndose una molécula de agua por cada rompimiento de enlace, como se indica en la siguiente reacción.



La hidrólisis del enlace peptídico supone la liberación de los grupos amino y carboxilo terminales mediante los siguientes equilibrios ácido base en el medio; por tanto, el estado de protonización de una proteína depende del pH del medio (Prieto, 2007).



La hidrólisis de las proteínas da lugar a las siguientes especies intermedias, conformadas siempre por moléculas más pequeñas (Teijon, 2001):



Los péptidos son compuestos nitrogenados que se conforman por secuencias de aminoácidos provenientes de las proteínas. Constan de 3-20 aminoácidos y se liberan de la proteína original después de la hidrólisis (Möller *et al.*, 2008).

Las secuencias de aminoácidos liberadas dependen del proceso de hidrólisis utilizado y su actividad biológica es atribuida a la proteína de origen.

En el caso de las péptidos del suero de la leche, la mayor parte de las actividades biológicas se deben principalmente a péptidos de menor tamaño (3 a 10 aminoácidos) (Alvarado y Guerra, 2012).

Cada una de estas especies se puede diferenciar por su solubilidad y su correspondencia con los pesos moleculares medios y contenido de nitrógeno amino, tal como se muestra en la tabla 1.3.

Tabla 1.3 Nitrógeno amino/ nitrógeno total de las especies proteicas, Prieto (2007).

Especie proteica	Peso molecular (g/mol)	Nitrógeno amino/nitrógeno total
Proteínas	>20000	<0.01
Proteosas	5000-10000	<0.01
Peptonas	1000-6000	0.1-0.5
Péptidos	200-500	0.5-0.8
Aminoácidos	75-200	0.8-0.9

La hidrólisis química, ácida o alcalina, consiste básicamente en la acción de alguno de estos compuestos para romper los enlaces peptídicos con ayuda de altas temperaturas. Sin embargo, por su rápida acción y difícil control, en muchos de los casos, este tipo hidrólisis destruye totalmente ciertos grupos de aminoácidos.

En el caso de la ácida, destruye el triptófano y puede alterar otros como la cisteína y la tirosina (Battaner, 1993). En la hidrólisis alcalina con NaOH a temperatura de ebullición, el triptófano no se destruye, pero sí un porcentaje de cisteína, cistina, serina, trionina, asparraguina y glutamina (Badui, 2006). En ambos métodos

químicos se obtiene un producto de bajo valor nutricional ya que se presenta la destrucción de aminoácidos esenciales en las proteínas.

1.3.1 Hidrólisis enzimática

A diferencia de la hidrólisis química, la hidrólisis enzimática de proteínas se consigue por medio de la acción de una enzima pura o por fermentación, lo cual sucede al poner en contacto el sustrato proteico con biomasa de microorganismos proteolíticos que segregan la enzima para llevar a cabo la hidrólisis por su afinidad al sustrato (Gil, 2005).

La hidrólisis con enzimas puras tienen varias ventajas: 1) un alto rendimiento de hidrólisis por la acción catalítica directa de la enzima sobre las proteínas, 2) La especificidad de acción de la enzima, lo que posibilita el control de las características en el producto final y 3) Las condiciones de reacción son suaves, en comparación con la química, lo que permite obtener un producto soluble de elevada calidad. Sin embargo, una de las desventajas, es el costo de las enzimas puras y la necesidad de su inactivación una vez concluida la hidrólisis, lo que puede generar productos indeseados porque se utilizan altas temperaturas o condiciones extremas de pH para lograr dicha inactivación.

En la tabla 1.4 se resume la información sobre algunas enzimas que se han utilizado para hidrolizar proteínas del suero lácteo y el sitio en el que actúan. Dependiendo del sitio de acción en el que actúan la enzima (sitio activo). Las enzimas que hidrolizan proteínas se clasifican en a) endopeptidasas, las cuales pueden ser serinoproteasas, cisteínproteasas, metaloproteasas y aspartatoproteasas y b) exopeptidasas, clasificadas como aminopeptidasas, carboxipeptidasas o dipeptidasas. Las primeras hidrolizan enlaces al azar en el interior de la cadena polipeptídica, y las segundas, separan aminoácidos y dipéptidos de los extremos de las cadenas polipépticas (Koolman y Klaushenrich, 2004; Badui, 2006).

Tabla 1.4 Tipos de enzimas proteasas, fuente, sitio activo y condiciones en las que actúan Benítez *et al.*, (2008)

Tipo de proteasa	Nombre	Fuente	Temperatura (°C)	Intervalo de pH	Sitio activo
Serinproteasa					
Animal	Tripsina	Bovino, Porcino	30-60	7-9	Lisina o arginina
	Quimiotripsina		45-55	8-9	Triptófano leucina, tirosina o fenilalanina
	Elastasa			6-10	Alanina
Bacteriana	<i>Subtilisin Carlsberg</i>	<i>B licheniformis</i>	50-60	6-10	
	Alcalasa24L	<i>B licheniformis</i>	55-70	6.5-8.5	Aminoácidos hidrófobos
	Subst.BPN	<i>B Amyloliquefaciens</i>	40-55	6-10	
	<i>Subtilisin Novo</i>	<i>B Amyloliquefaciens</i>	40-60		
Cisteinproteasas					
Plantas	Papaína	Papaya	40-75	5-8	Leucina, valina o fenilalanina
	Bromelaína	Piña	20-65	5-8	Aminoácidos hidrófobos
	Ficina	Látex de ficus		5-8	
Aspartato proteasas					
Animal	Pepsina	Porcino, bovino	30-60	1-4	Leucina, tirosina o fenilalanina
	Quimisina	Becerro	50-60	4-6	Triptófano, fenilalanina o tirosina
Fúngica	<i>Aspergillus</i> peptidasa A	<i>Aspergillus saitoi</i>	35-40	2-5	Ácido glutámico, ácido aspártico o Leucina
	Mewlasa	<i>Rhizopus sp</i>	40-50	3-6	Leucina, tirosina o fenilalanina
Metaloproteasas					
Animal	Carboxipeptidasa A	Páncreas		7-8	Carbonilo terminal de los aminoácidos excepto para pro, arg y lys
Bacteriana	Neutrasa	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	40-55	6-7.5	Leucina, valina o fenilalanina
	Termolisina	<i>B. Thermoproteolyticus</i>		7-9	Leucina, valina o fenilalanina
Preparaciones enzimáticas					
Mezcla de papaína, quimopapaína y lisozima	Papaína cruda	Fruto de la papaya		5-9	Todos los aminoácidos
Mezcla de tripsina, quimiotripsina, elastasa y carbopepxi Dasa	Pancreatina	Páncreas (bovino y porcino)	30-40	7-9	Todos los aminoácidos
Mezcla de serin aspartato y metaloproteasas	Verón P Sumicina LP				Todos los aminoácidos
	Biocina A	<i>Aspergillus oryzae</i>	40-55	4-8	
Mezcla de endo y exoproteasas	Pronasa	<i>Streptomyces griseus</i>		7-9	Todos los aminoácidos

1.3.1.1 Hidrólisis con biomasa microbiana

La hidrólisis con biomasa microbiana puede hacerse mediante dos tipos de microorganismos. 1) Microorganismos probióticos 2) Microorganismos con sistemas enzimáticos proteolíticos.

Cuando la hidrólisis se lleva a cabo con probióticos, las bacterias lácticas se adicionan como biomasa viva al alimento y este es consumido conjuntamente con dicha biomasa, ya que dichos microorganismos tienen efectos positivos para los consumidores. Los probióticos pueden ejercer beneficios en el tracto digestivo, en el sistema inmunológico, en el sistema cardiovascular y en el tracto urogenital (Bensussan, 2002; Guarner, 2002).

Los probióticos hidrolizan las proteínas del alimento proteico hasta la liberación de péptidos, los cuales pueden tener actividad biológica y contribuir a los efectos benéficos para la salud (Silva y Malcata, 2005).

Algunos probióticos conocidos del género *Lactococcus* son *L. lactis*, *sp lactis* y *L. lactis sp cremoris*; del género *Lactobacillus*, *Bacillus subtilis*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei sp casei* y *L. delbrueckii sp delbrueckii*; y del género *Streptococcus*, *S. thermophilus*, entre otros. Los probióticos se emplean para elaborar diferentes tipos de queso y yogurt.

En el otro caso de hidrólisis con biomasa microbiana, el proceso tiene lugar debido a la secreción de enzimas intracelulares o extracelulares provenientes del microorganismo, por lo que la hidrólisis no es atribuida a una sola de sus enzimas, sino a un conjunto de las mismas. Este tipo de hidrólisis tiene ventajas por la cantidad de enzimas que pueden secretar en contacto con el sustrato y puede ser controlada para la liberación de péptidos deseados. La biomasa se retira al final por filtración.

En la tabla 1.5 se listan los microorganismos más usados en el sector comercial como productores de enzimas proteolíticas y las condiciones físicas en las que actúan. Éstos han demostrado un alto rendimiento en la generación de enzimas,

sus productos son inocuos, ya que no sintetizan de forma paralela agentes tóxicos o antibióticos (Badui, 2006).

Tabla 1.5 Microorganismos más usados comercialmente en la obtención de enzimas proteolíticas y las condiciones de acción de la enzima

Microorganismo	Enzima	pH	T(°C)
<i>B. licheniformis</i>	Alcalasa 0.6L	4 - 11.5	50 – 60
<i>B. subtilis</i>	Neutrasa	6 - 8	45 – 55
<i>B. subtilis</i>	Protease 660L	7 - 10	50 – 70
<i>B. subtilis</i>	Corolase 7089	6 - 8.5	55 – 60
<i>A. oryzae</i>	Fungal-protease	6 - 9	45 – 55
<i>A. oryzae</i>	Colorase PS	5 - 7	50 – 60
<i>A. oryzae</i>	Corolase 7092	6 - 9	35 – 40
<i>A. oryzae</i>	Corolase 7093	7 - 9	40 – 50
<i>A. niger</i>	Corolase 7107	2 - 3	30 – 50

En la actualidad, la mayoría de los procesos de hidrólisis de proteínas, se realizan con enzimas purificadas y su investigación se realiza para ser más eficiente el proceso y el control de la hidrólisis.

Una importante bacteria estudiada en los últimos años, debido a su capacidad proteolítica es el *B. subtilis*.

El *B. subtilis* pertenece a la familia de *Bacillaceae*; es una bacteria Gram (+), en forma de varilla. Posee un flagelo que le permite una motilidad más rápida, es anaerobio facultativo y tiene la capacidad de generar endoesporas que le permiten tolerar condiciones ambientales extremas (Olmos y Paniagua, 2015).

Específicamente, las diferentes especies de *Bacillus* sintetizan y excretan una gran cantidad de enzimas proteolíticas durante su crecimiento y esporulación de forma extracelular. La mayoría de las proteinasas extracelulares aisladas de varias cepas de *Bacillus subtilis* son de dos tipos: 1) Las metaloproteasas neutras como la neutrasa que se activan a valores de pH neutro y 2) La serin proteasas como la *subtilisina* que se activan a pH alcalinos (Millet, 1970; Castro *et al.*, 1996).

De acuerdo a la tabla 1.4, ambos tipos de enzimas tienen afinidad por sitios activos correspondientes a aminoácidos como prolina, lisina, arginina y fenilalanina, entre otros.

1.3.1.2 Inmovilización de biomasa microbiana

La inmovilización de biomasa proveniente de los microorganismos se puede definir como el confinamiento de las células en una cierta región física delimitada con un material, en los cuales se retienen sus actividades catalíticas. Esta alternativa es utilizada para mejorar los procesos biocatalíticos.

En el caso particular para hacer más eficiente el proceso de hidrólisis de las proteínas, ya que mejora la capacidad de secreción de enzimas, su liberación es en forma controlada, el crecimiento de la biomasa también es controlado y su separación de los productos hidrolizados también es más sencillo, evitando su contaminación por biomasa microbiana, así como el uso de condiciones extremas (pH y temperatura) para la inactivación de enzimas, cuando se trata del uso de enzimas puras.

La forma de inmovilizar la biomasa de los microorganismos puede ser por atrapamiento o inclusión en membranas.

El atrapamiento consiste en fijar la biomasa en las cavidades interiores de una matriz o pared sólida porosa.

En la inclusión en membranas, la biomasa se encuentra introducida en dichas membranas, las cuales forman generalmente cápsulas de confinamiento de la biomasa en forma de esfera u otras figuras geométricas llamadas sistemas de encapsulamiento. Por tanto, estos sistemas deben ser porosos para que permita el contacto del microorganismo con el sustrato.

1.3.1.2.1 Materiales utilizados para inmovilización de biomasa microbiana

Entre los materiales más utilizados para llevar a cabo el encapsulamiento de biomasa de microorganismos, se encuentran los biopolímeros (García *et al.*, 2015). Sin embargo, debido a su frecuente fragilidad mecánica, éstos son utilizados generalmente como materiales compuestos o compósitos, los cuales resultan de la unión de dos o más polímeros, ya sea por integración de éstos o por superposición de capas.

Los compósitos son preparados de acuerdo a las características que deben de conservar los sistemas encapsulantes, ya que son utilizados para mejorar las características que los polímeros poseen de forma individual. En el caso de su aplicación en la encapsulación de biomasa, los compósitos deben proporcionar al encapsulado, porosidad, resistencia mecánica a la agitación, hidratación y un medio de proliferación de biomasa entre otros.

Casi todos los compósitos están constituidos por dos fases, una, sustentante o matriz, y otra, complementaria, que está inmersa o firmemente adherida a la primera. La matriz es la que soporta a los demás polímeros; suele encontrarse en mayor cantidad en el compósito y es frecuentemente, la menos resistente. La fase complementaria, por tanto, mejora las propiedades de la matriz. Dentro de los polímeros utilizados como fase matriz en la preparación de compósitos destinados a encapsular la biomasa microbiana, se encuentran los polisacáridos como el alginato de sodio, quitosano, celulosa, almidón, dextrano, agar y agarosa. Mientras que la fase complementaria puede ser, proteínas fibrosas como el colágeno, la gelatina y la queratina. Pero además, los mismos polisacáridos pueden ser materiales de fase complementaria.

En algunos casos, como fase complementaria, también se utilizan biopolímeros sintéticos como, poliamidas, poliésteres, policarbonatos, poliuretanos, poli (alcohol vinílico), polietilenglicol, entre otros. Estos polímeros se unen para proporcionar o incrementar las propiedades estructurales (dureza, resistencia mecánica),

resistencia a la temperatura, estabilización (inhiben la degradación del polímero, protegiéndolo de la luz, oxígeno y temperatura) y plastificantes por medio de entrecruzamientos.

Particularmente los alginatos de sodio son frecuentemente utilizados como fase matriz en un compósito o bien como polímero único en un material encapsulante, debido a que por su naturaleza aniónica, pueden formar geles resistentes por uniones tipo caja de huevo en presencia de cationes divalentes como calcio, bario y estroncio, formando membranas encapsulantes (Neira *et al.*, 2013). En la figura 1.1 se muestra una imagen que representa la estructura química del alginato de sodio y su unión con calcio.

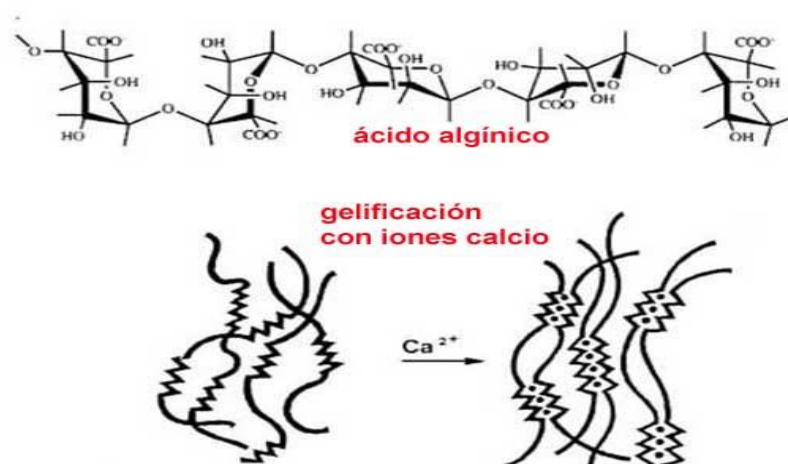


Figura 1.1 Estructura química del alginato de sodio y su unión con iones calcio

Otro polímero natural utilizado para el mismo fin, es el quitosano. Este polímero es un polielectrolito catiónico debido a los grupos amino ($-NH_3^+$) que contiene (Alfaro, 2012). Su capacidad catiónica depende de esos grupos que se encuentren libres. El quitosano desacetilado, posee un elevado número de cargas, elevando su capacidad de agregación con compuestos polianiónicos. La forma desacetilada también le confieren al quitosano la propiedad de solubilidad, de manera que solo es soluble si se tiene más del 80-85 % de grado de desacetilación. Además, cuando el pK_a se aproxima a un valor de 6.5, es soluble en soluciones de ácidos minerales y orgánicos como el ácido acético, el fórmico, el cítrico, el clorhídrico y algunos otros que tengan un pH menor de 6.5.

En la figura 1.2 se muestra una imagen de la estructura química del quitosano. Cuando el quitosano se combina con el alginato, se forma un compósito de dos polisacáridos cuyas propiedades iónicas se potencializan, debido a que entre ellos se unen por enlaces covalentes proporcionando mayor resistencia mecánica al compósito; ya que al conjuntarse poseen terminaciones catiónicas y aniónicas que permiten mejorar su capacidad de gelificación y de resistencia.

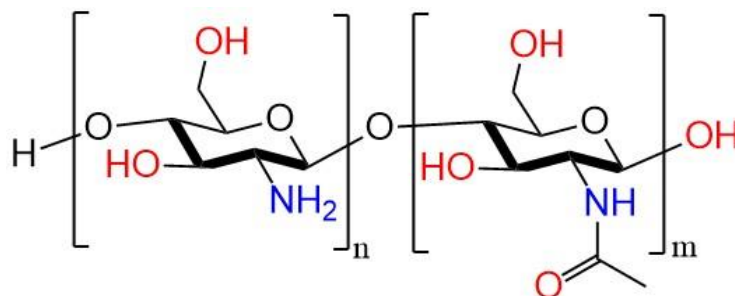


Figura 1.2 Estructura química del quitosano.

Al aceptar cationes o aniones dentro de su estructura posibilitan la formación de un complejo polielectrolito delimitado por las interacciones electrostáticas de carga aniónica y catiónica preparados para la inserción de cationes como el Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , $-\text{NH}_3^+$, $=\text{NH}_2^+$ y aniones como $-\text{COO}^-$, $-\text{CSS}^-$ y $-\text{SO}_3^-$. Otras interacciones que se presentan provienen de puentes de hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas y las fuerzas de Van der Waals (Cárcamo, 2005, Chowdhury *et al.*, 2011).

Por otro lado, algunos de los polímeros que se utilizan en la preparación de compósitos, como fase complementaria del quitosano e incluso como reticulante, son el polietilenglicol (PEG) y glutaraldehído. La capacidad reticulante que poseen ambos materiales, es aprovechada para formar estructuras resistentes, particularmente con quitosano.

El glutaraldehído es un dialdehído saturado se reconoce como un compuesto intermedio entre los alcoholes y los ácidos. Es un agente alquilante modificador de grupos funcionales. La reticulación o entrecruzamiento del glutaraldehído con el

quitosano, le disminuye su capacidad para absorber agua. Esta reticulación se lleva a cabo entre los grupos amino y aldehído formando un enlace imino muy estable (Monteiro y Airoidi, 1999). Su aplicación debe ser controlada en pequeñas cantidades, ya que puede ser tóxico para los microorganismos en concentraciones altas.

El polietilenglicol (PEG) es un poli éter lineal o ramificado con un grupo hidroxilo en cada extremo (Mayolo *et al.*, 2010). Su fórmula es $\text{H}-(\text{OCH}_2 \text{CH}_2)_n-\text{OH}$; es altamente soluble en agua, así como en varios solventes orgánicos y está aprobado por la administración de alimentos y fármacos (FDA) para su administración en seres humanos es inerte no tóxico, y no es inmunogénico además es desechado fácilmente por el cuerpo a través del riñón e hígado.

En la figura 1.3 se muestran imágenes de las estructuras químicas del glutaraldehído y del PEG.

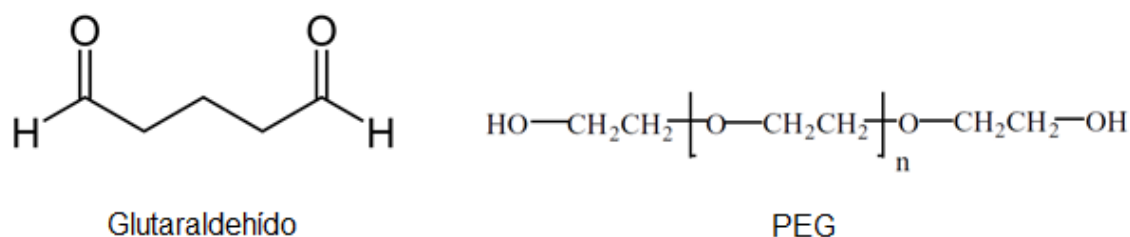


Figura 1.3 Estructuras químicas del glutaraldehído y del PEG

Los estudios siguientes muestran los resultados obtenidos con el uso de glutaraldehído y PEG en diferentes compósitos de alginato y quitosano.

Baysal *et al.* (2013), demostró que un compósito de alginato y quitosano utilizando, N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC), como reticulante, permitió la unión covalente de las dos macromoléculas. Thakkar (2005), preparó matrices esféricas de gelatina con dos agentes de reticulación, el glutaraldehído y el formaldehído. Además, agregó PEG como agente antiagregante. Nnamonu *et al.* (2012) utilizaron matrices de quitosano o almidón reticulado con alginato a través de la interacción iónica entre

los residuos carboxilo de alginato y los terminales del amino del quitosano. La interacción también podría ser a través de enlaces de hidrógeno intermoleculares que es el mecanismo de reticulación alginato-almidón.

La reticulación o entrecruzamiento reduce la capacidad del quitosano para absorber agua. El estudio de la reticulación del quitosano con el glutaraldehído fue hecho por Monteiro y Airoidi (1999). La modificación del polímero se llevó a cabo entre los grupos amino del quitosano, los cuales interactúan con los grupos aldehído de glutaraldehído para formar un enlace imino muy estable. Así Baysal *et al.* (2013) obtuvo un polímero híbrido de alginato y quitosano utilizando, N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC), como reticulante el cual permitió la unión covalente de las dos macromoléculas. Thakkar (2005), preparó matrices esféricas de gelatina con dos agentes de reticulación: el glutaraldehído y el formaldehído. Además agregó polietilenglicol como agente antiagregante.

1.4 Liberación de péptidos por la acción de la hidrólisis de proteínas

El seguimiento y control de un proceso de hidrólisis de proteínas, se evalúa mediante el grado de hidrólisis (GH) o liberación de péptidos de las proteínas. Éste es un criterio cuantitativo para la medida del avance de la reacción proteolítica y se define como el porcentaje de enlaces peptídicos fragmentados en relación al total de enlaces peptídicos de la proteína original (Guadix *et al.*, 2000).

El GH está determinado por las condiciones utilizadas tales como la concentración de sustrato, la velocidad enzima sustrato, el tiempo de incubación y las condiciones fisicoquímicas (pH, temperatura). Otro factor que determina el GH es la naturaleza de la enzima, caracterizada por su actividad específica y su tipo de actividad.

Existen diferentes métodos para la estimación del GH (Spellman *et al.*, 2003), los cuales se basan fundamentalmente en, 1) Determinación de nitrógeno soluble tras la precipitación de la proteína con ácido tricloroacético (TCA), o la cuantificación directa de proteínas contenidas en el sustrato o remanente después de la hidrólisis. 2) Determinación de los grupos α -amino libres. 3) La valoración del protón liberado tras la ruptura de enlace peptídico a determinados valores de pH.

Los hidrolizados de proteínas se utilizan ampliamente en la industria alimentaria por sus propiedades funcionales, en nutrición infantil y clínica, así como una fuente de péptidos bioactivos. En general, los hidrolizados pueden clasificarse por su grado de hidrólisis en dos grupos. 1) Hidrolizados con un bajo grado de hidrólisis (inferior a 10 %). Se emplean fundamentalmente como modificadores de las propiedades funcionales de los alimentos. 2) Hidrolizados con un alto grado de hidrólisis (superior a 10 %). Se utilizan como fuente de nitrógeno en la formulación de alimentos infantiles y dietas especiales, así como para la obtención de moléculas terapéuticas

1.4.1 Propiedades biológicas de los péptidos

La actividad biológica de los péptidos es la capacidad de respuesta que presentan en el organismo, una vez que son suministrados o ingeridos (Clare y Swaisgood, 2000). En función de los grupos o terminación de los aminoácidos, los péptidos presentan diferentes propiedades biológicas, las cuales se describen a continuación.

1. Péptidos antihipertensivos (Hipotensivos). Juega un papel importante en la regulación de la presión sanguínea en mamíferos.
2. Péptidos opioides. Están vinculados con el control de la motilidad intestinal, comportamiento emocional, analgesia y saciedad.
3. Péptidos antioxidantes. Son aquellos péptidos, de 4 a 20 kDa, que tienen la habilidad de inhibir los daños causados por la oxidación lipídica.
4. Péptidos antimicrobianos. Alteran la bicapa lipídica de los microorganismos, causando una modificación similar a la de la célula.
5. Péptidos inmunomoduladores. Estos pueden jugar un papel importante en la modulación de la respuesta inmunológica.

A la fecha, pocos estudios han reportado el papel que juegan algunas fracciones peptídicas del lacto suero sobre la salud de los consumidores, en comparación con

las derivadas de las caseínas, que han recibido mayor atención (Alvarado y Guerra, 2012).

1.4.1.1 Péptidos antihipertensivos

La hipertensión arterial es la elevación persistente de la presión que ejerce la sangre bombeada por el corazón sobre los vasos sanguíneos (Hong *et al.*, 2003) y está asociada de forma proporcional, tanto a la magnitud como a la duración de la hipertensión, a daños ocasionados en órganos vitales como el corazón, cerebro, retina y riñón. Los niveles normales de presión arterial de una persona sana deben ser de 120/80 mmHg (presión sistólica/diastólica). Sin embargo, una presión arterial alta se considera cuando los niveles sobrepasan de 130/85 mmHg. Para el control de la hipertensión se han desarrollado diferentes tipos de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA). Los IECA actúan en el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRA) inhibiendo la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La ECA es una enzima multifuncional localizada en diversos tejidos, la cual cataliza la conversión de angiotensina I, un decapeptido inactivo, en angiotensina II, un octapeptido de potente acción vaso constrictora; provoca la contracción rápida de las arteriolas y, por tanto, el incremento de la presión arterial (Mulero *et al.*, 2011).

Los fármacos IECA más utilizados en la actualidad son péptidos sintéticos como el captopril, lisinopril, ramipril o enanpril. Sin embargo, el uso de medicamentos sintéticos para el control de la hipertensión puede causar diversos efectos secundarios en el organismo tales como, tos, salpullido en la piel, perturbación en el sabor, entre otros (Torruco *et al.*, 2008).

Algunos estudios que hacen referencia a secuencias de aminoácidos con actividad antihipertensiva, se muestran en la tabla 1.6.

Tabla 1.6 Algunos péptidos obtenidos de hidrolizados de proteínas del suero de leche con propiedades antihipertensivas

Proteína	Enzimas Microorganismos	Secuencia de péptidos	Actividad biológica	Referencias
β -Lg, β -caseína, k- caseína	Pepsina	PEQSLACQCL, QSLVYPFTGPI, ARHPHPL	Antihipertensiva	Ibrahim <i>et al.</i> 2017
Hidrolizados leche de buffala	Papaína Pepsina Tripsina	FPGPIPK IPPKIVPN QPPQ	Antihipertensiva	Abbel-Hamid <i>et al.</i> 2017
β -caseína	Endoproteinasa de <i>Aspergillus</i> <i>niger</i>	IQA VEP	Antihipertensiva	Norris <i>et al.</i> 2014
caseína	Subtilisina Basilolisina tripsina	MKP	Antihipertensiva	Yamada <i>et al.</i> 2013
β -caseína, k- caseína	Neutral proteasa	RYPsyG DERF	Antihipertensiva	Jiang <i>et al.</i> 2010
Caseína	Pepsina	RYLG AYFYPEL YQKFPQI	Antihipertensiva	Del mar-Contreras <i>et al.</i> 2009
Na-Caseína,	Pepsina, tripsina, proteínasa-K, termolisina	LYQQP	Antihipertensiva	Otte <i>et al.</i> 2007
Caprine β -Lg	Termolisina	LQKW, LLF, LVRT	Antihipertensiva	Hernández <i>et al.</i> 2007
β -caseína y k-caseína de Yack	Acalasa	PLPLL PPEIN	Antihipertensiva	Mao <i>et al.</i> 2007
Lactoferrina	Pepsina, tripsina y quimotripsina	LRPVAA	Antihipertensiva	Lee <i>et al.</i> 2006
β -Lg, α -La	Tripsina	LDAQSAPLR, VFK, VGINXW, LAHK	Antihipertensiva	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> 2001
α -La	Pepsina y tripsina	YGLF	Antihipertensiva	Nurminen <i>et al.</i> 2000

Así, en los últimos años, los científicos han centrado sus estudios en la obtención de péptidos naturales con diferentes actividades biológicas derivados de diversas fuentes proteicas de alimentos, entre ellas las proteínas de suero de leche en las cuales se han encontrado péptidos con actividad antihipertensiva y otras.

A la fecha existen varios reportes que muestran la actividad antihipertensiva *in vitro* de péptidos derivados del suero lácteo. La mayoría se basa en estudios de

liberación de péptidos por la actividad proteolítica de bacterias lácticas en leches fermentadas comerciales (González *et al.*, 2011) utilizando *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NCFB 712 (Figuerola *et al.*, 2012).

El potencial antihipertensivo de un péptido depende de su capacidad para alcanzar la circulación sanguínea sin ser degradado por las enzimas intestinales o sanguíneas, e inhibir la ECA (Hernández *et al.*, 2009; Muro *et al.*, 2013). Una propuesta para que esta acción se lleve a cabo es la encapsulación de los péptidos con actividad biológica.

1.5 Encapsulación de péptidos con actividad biológica derivados de las proteínas del suero

Los péptidos de suero lácteo son biomoléculas que pueden poseer actividad biológica; por tanto llegan a considerarse como moléculas terapéuticas. Sin embargo, por su naturaleza, sufren de inestabilidad, pérdida de actividad temprana y degradación en el tracto gastrointestinal una vez que se administran. Por lo que sus beneficios al organismo se han visto drásticamente cuestionados y los estudios clínicos que demuestran dichos beneficios son escasos (Muro *et al.*, 2011).

Recientemente, la encapsulación se ha sugerido como una alternativa importante de protección y liberación controlada de este tipo de sustancias (Muro *et al.*, 2014; Alvarado *et al.*, 2016). No obstante, pese a que en la literatura existen muchos trabajos sobre encapsulamiento de biomoléculas terapéuticas, en el caso de la encapsulación de proteínas y péptidos del suero, las investigaciones aún son muy pocas, ya que estos se encuentran actualmente en el círculo de moléculas biológicas sensibles, en el que muchas de este tipo de fármacos siguen en estudio, tal es el caso de la insulina cuya administración aún permanece realizándose por vía intravenosa (Muro *et al.*, 2014).

La encapsulación de estas sustancias significa la incorporación de la biomolécula en diferentes sistemas de confinamiento como son esferas, liposomas, emulsiones, dendrímeros y películas entre otros. Los cuales son utilizados para dos fines principalmente; protegerlos contra procesos de inactivación y para controlar su entrega espacial y temporal en el cuerpo humano (Bosio, 2012, Muro *et al.*, 2014).

Tanto el método de encapsulamiento, como la selección del material para llevar a cabo dicho proceso, depende del tipo de molécula que se desee incluir, así como de la aplicación y propiedades del producto que se requiera obtener. Para ello, se han utilizado diferentes materiales como grasas (cera de carnauba, alcohol esteárico, ácido esteárico); proteínas (colágeno, gelatina, queratina, albúmina, y proteínas de suero lácteo); biopolímeros tipo polisacáridos (alginato, quitosano, celulosa, almidón, dextrano, agar, agarosa, pectina, goma arábiga, goma xantana, k-carragenina); otros biopolímeros como el poli(ácido láctico, policaprolactona, poli (alcohol vinílico) (PVA), poli (ácido láctico- co-glicólico) (PLGA). Además de polímeros sintéticos como poliestireno, poliacrilatos y poliacrilamidas.

Los compósitos a base de los anteriores materiales son actualmente los más estudiados. Destacan los biopolímeros de naturaleza polisacárida que frecuentemente son utilizados como fase matriz en el compósito. La síntesis de los compósitos de encapsulamiento puede ser resumida en cuatro mecanismos básicos: entrecruzamiento covalente, entrecruzamiento inotrópico, formación de complejos polielectrolitos, y auto ensamblaje de polisacáridos modificados (Gandini, 2010; Bosio, 2012).

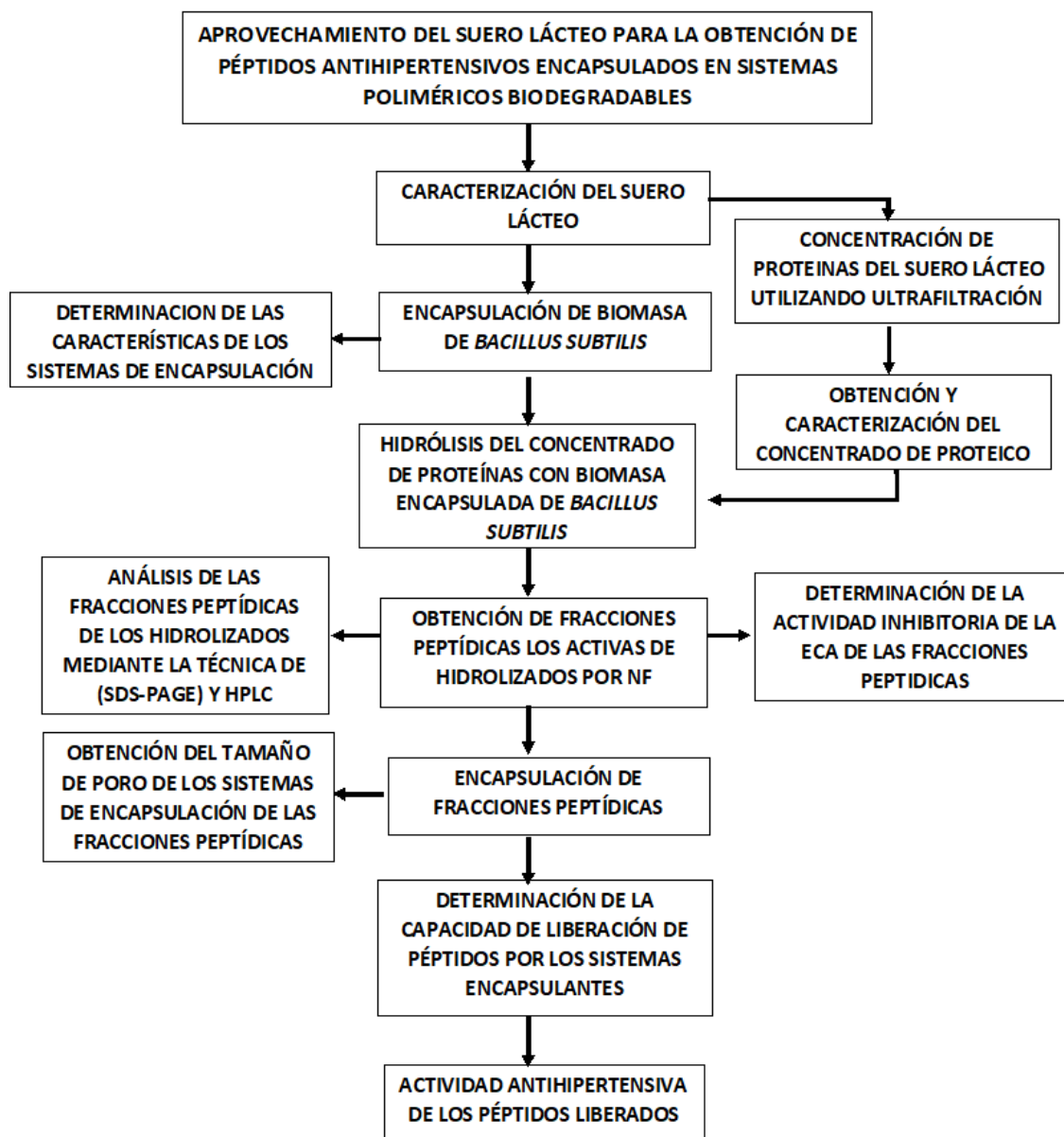
En la tabla 1.7, se presentan algunos de los resultados encontrados sobre el encapsulamiento de péptidos y proteínas de origen láctico, donde se incluye el sistema encapsulante y material utilizado.

Tabla 1.7 Investigaciones sobre la encapsulación de proteínas y péptidos de leche

Referencias	Material y sistema encapsulante	Proteínas y péptidos de suero de leche	Resultados
Mohan <i>et al.</i> 2016	Nanoliposomas de lecitina de soya	Péptidos bioactivos de suero de leche	Los péptidos mostraron una interacción con las regiones polares internas y externas de los liposomas mejorando la eficiencia de encapsulación.
Zhang <i>et al.</i> 2016	Esferas de alginato	Proteínas de suero lácteo	La atracción electrostática de las proteínas y el alginato se mantuvieron fuertes a pH 3 permitiendo una buena retención y un debilitamiento a pH 7 demostrando una alta liberación de los péptidos.
Bokkhihim <i>et al.</i> 2016	Esferas de alginato	Lactoferrina	El estudio mostro que la encapsulación protegió de la acción de la pepsina en el fluido gástrico simulado y permitió su liberación en el fluido intestinal
Gomez-Mascaraque <i>et al.</i> 2016	Microcápsulas de gelatina o quitosano	Hidrolizados de concentrados de proteínas de suero	El quitosano fue más efectivo que la gelatina como encapsulante mantuvo la estabilización de los péptidos sin afectar su perfil.
Rao <i>et al.</i> 2016	Microcápsulas de maltodextrina-goma arábica	Hidrolizados de caseína	Los hidrolizados encapsulados mostraron una retención de actividad antioxidante del 93 % con respecto a los hidrolizados libres.
Kavianinia <i>et al.</i> 2014	Microesferas de quitosano con dianhídrido piromelítico (Cts-PMDA)	Albúmina de suero bobino	Las esferas de Cts-PMDA mostraron un gran potencial para la liberación de BSA en el colon de 80-84 % de liberación de la albumina después de 12 h.
O'Neill <i>et al.</i> 2015	Microcápsulas de suero lácteo	Riboflavina, péptidos y aminoácidos	Se obtuvieron una mayor eficiencia de encapsulación debido a las Interacciones hidrofóbicas entre el compuesto y la microcapsula
Ma <i>et al.</i> 2014	Microcapsulas de alginato	Hidrolizados de proteínas de suero	El encapsulado no influyó en la actividad inmunomodulatoria de los hidrolizados y redujo el sabor amargo de los mismos.
Yang <i>et al.</i> 2012	Encapsulados de maltodextrina y β -ciclodextrina	Hidrolizados de proteínas de suero	La encapsulación mejoró la estabilidad de los hidrolizados y atenuó su sabor amargo.
Yu <i>et al.</i> 2009	Micropartículas de quitosano, alginato y pectina	Seroalbúmina bovina (BSA)	La liberación <i>in vitro</i> mostró una alta sensibilidad de las partículas al pH exhibiendo una liberación lenta a pH 1.2 y pH 5 y una liberación rápida a pH 7.4.

2 MÉTODO

En la Figura 2.1 se muestra el diagrama que contiene las etapas que conforman la investigación y enseguida se hace la descripción de cada una de ellas.



2.1 Diagrama con las etapas de la investigación

2.1 Caracterización del suero lácteo

El suero lácteo fresco fue proporcionado por una empresa artesanal de elaboración de queso. Fue almacenado para su conservación en recipientes de plástico de un litro a 4 °C para su posterior caracterización y uso. Los parámetros considerados en la caracterización fueron pH, acidez, densidad, cenizas, sólidos totales, calcio, azúcares reductores y proteínas. Estos fueron determinados de acuerdo a los siguientes métodos.

1. Para la determinación de pH. Se consultó la norma mexicana NMX-F-317-S-19, la cual propone el procedimiento siguiente: se homogenizó el lactosuero mediante agitación y se tomó lectura de la muestra con un potenciómetro portátil marca HANNA HI 9126, calibrado previamente con soluciones reguladoras de pH 4 y pH 7, la lectura fue leída y registrada a una temperatura de 20 ± 0.5 °C.

2. Determinación de acidez. Esta prueba se realizó de acuerdo como se indica en la norma mexicana NMX-F-420-1982. Se colocaron 20 cm³ de muestra en un matraz Erlenmeyer se diluyeron hasta aumentar dos veces su volumen con agua libre de CO₂. Posteriormente se añadió un cm³ de solución de fenolftaleína como indicador. Se tituló con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N hasta la aparición de un color rosado persistente de 15 a 30 segundo. Se anotó el gasto de NaOH para determinar la acidez de la muestra. Este ensayo se realizó por triplicado y el cálculo se hizo de acuerdo a la ecuación 2.1.

$$A = \frac{(V)(N)(90)}{M} \quad (2.1)$$

A= Acidez en gr/L del ácido láctico

V= Volumen de solución de hidróxido de sodio 0.1N gastado en la titulación en mL.

M= Volumen de la muestra en cm³

N = Normalidad del NaOH

3. Determinación de la densidad. Esta determinación se realizó bajo la norma mexicana NMX-F-424-S-1982. Se colocó una muestra de 450 mL, homogénea de

lactosuero a temperatura de 15 °C en una probeta de 500 mL, el densímetro de Quévenne fue introducido en el suero lácteo para hacer la lectura.

4. Determinación de azúcares reductores. Se prepararon dos soluciones de Fehling y una solución de glucosa al 2 % (p/v). Fehling I, 3.5g de sulfato de cobre pentahidratado en 50 de agua destilada. Fehling II, 17.5g de tartrato de sodio potásico y 5g de hidróxido de sodio en 50mL de agua destilada. Se preparó el licor de Fehling con 5 mL de solución Fehling I y 5 mL de solución Fehling II más 50 mL de agua destilada y 4 gotas de azul de metileno, la solución se calentó hasta ebullición con agitación constante y se tituló con solución de glucosa al 2 %. Se repitió el proceso en el cual se sustituyó la solución de glucosa al 2 % por el lactosuero y se anotó el gasto del mismo, como datos para el cálculo de azúcares reductores de acuerdo a la ecuación 2.2.

$$R = \frac{(2G)(F)}{G'} \quad (2.2)$$

R= Cantidad de azúcares reductores (g/L)

G= Gasto de suero necesario para decolorar el licor de Fehling

G´= Gasto de glucosa (2 %) necesario para decolorar el licor de Fehling

F= Factor de dilución

5. Determinación de Calcio. Para esta determinación se siguió el siguiente procedimiento. Se colocaron 50 mL de suero en un matraz erlenmeyer, se agregó NaOH 1 N hasta ajustar el valor de pH entre 12 y 13, se le adicionó 0.1 g de murexida y se tituló con solución 0.01 M EDTA con agitación continua hasta un vire de color de rosa a violeta, el dato obtenido del gasto de EDTA se utilizó en la ecuación 2.3 para calcular la cantidad de calcio presente.

$$C = \frac{(A)(N)(20.04)(1000)}{V} \quad (2.3)$$

C= mg Ca⁺²/L

A= Volumen gastado de EDTA en mL

N= Normalidad del EDTA

V= Volumen de suero en mL

6. Determinación de sólidos totales. La prueba se realizó bajo la norma mexicana NMX-F-426-1982. Se pesaron tres cápsulas de porcelana en una báscula analítica, se transfirieron a una estufa durante 30 minutos y posteriormente al desecador por 15 minutos este procedimiento se repitió hasta mantener las cápsulas de porcelana a masa constante. Se añadieron 2 cm³ de leche a cada una de las cápsulas y se colocaron en un baño de agua en ebullición hasta sequedad. Las cápsulas se secaron durante 3 horas a 100 °C. Una vez fría, se determinó la masa del residuo por diferencia de masas utilizando la ecuación 2.4.

$$S = \frac{(M_2 - M_1)(1000)}{M} \quad (2.4)$$

S = Sólidos totales en gr/L

M₂= Masa de la cápsula con residuo seco

M₁= Masa de la cápsula

M= Volumen de la muestra en mL.

7. Determinación de cenizas. La determinación de cenizas se hizo de acuerdo a la norma mexicana NMX-F-066-S-1978, la cual indica el siguiente procedimiento: los sólidos totales obtenidos en la etapa anterior se calcinaron en una mufla a 550 °C durante 3 horas. Para efectuar el cálculo de la cantidad de cenizas expresado en % se utilizó la ecuación 2.5.

$$C = \frac{(P - p)(100)}{M} \quad (2.5)$$

C = Cenizas en %

P = Masa de la cápsula con cenizas en gramos

p= Masa de la cápsula vacía en gramos

M= Masa de la muestra en gramos

8. Determinación de proteínas. Para determinar las proteínas del suero lácteo empleado en este trabajo se utilizó el método de Biuret, como una reacción basada en la formación de un compuesto de color violeta entre los iones Cu^{2+} y los pares de electrones no compartidos del nitrógeno que forma parte de los enlaces peptídicos, presentando un máximo de absorción a 540 nm. Este ensayo fue llevado a cabo de la siguiente manera: primero se realizó una curva patrón como referente, para lo cual se utilizó una solución de Albumina de suero bovino (BSA) a concentración de 1 mg/mL, para ello se prepararon 11 tubos con solución de BSA y agua destilada como se muestra en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Volúmenes de la solución patrón de albúmina método de Biuret

No. de tubo	Albumina patrón (mL)	Agua (mL)	Volumen total (mL)
1	0	2.0	2.0
2	0.1	1.9	2.0
3	0.2	1.8	2.0
4	0.3	1.7	2.0
5	0.4	1.6	2.0
6	0.5	1.5	2.0
7	0.6	1.4	2.0
8	0.7	1.3	2.0
9	0.8	1.2	2.0
10	0.9	1.1	2.0
11	1.0	1.0	2.0

A cada tubo se le añadió 2 mL de reactivo de Biuret, se dejaron reaccionar durante 15 minutos en un baño de agua a 37 °C. La concentración de proteínas se midió en un espectrofotómetro marca Perkin Elmer modelo Lambda 35 UV-Vis a una longitud de onda de 540 nm.

La curva patrón se utilizó como referente para las pruebas repetidas en la selección de un factor de dilución adecuado para la determinación de proteínas en las muestras.

2.2 Concentración de proteínas del suero lácteo utilizando ultrafiltración

Para el concentrado de proteínas se utilizó un equipo de ultrafiltración (UF) con una membrana cerámica microporosa con capa de óxido de titanio cubierta de carbón con un umbral de corte de 15 kDa. Las condiciones que se aplicaron en el proceso después de algunas pruebas fueron: un gasto de alimentación controlado con velocidad de la bomba de 40 rpm con una presión transmembranaria de 1.5 kg/cm². La temperatura y el pH del suero inicial fueron de 21 °C y pH de 6.3, respectivamente. El volumen inicial de la muestra fue de 500 mL.

2.2.1 Obtención y caracterización del concentrado proteico

El concentrado proveniente del proceso de UF de proteínas, se caracterizó con los procedimientos utilizados en la caracterización del suero lácteo, los cuales fueron mencionados en el apartado 2.1.

Además se determinó el rendimiento (Y) expresado en porcentaje de cada uno de parámetros que representan la caracterización del concentrado de proteínas del lacto suero mediante la ecuación 2.6.

$$Y = \frac{(V_2)(C_2)(100)}{(V_1)(C_2)} \quad (2.6)$$

Y = Rendimiento de los concentrados

C₂= Concentración final del parámetro en el concentrado.

C₁= Concentración inicial del parámetro en el suero.

V₁= Volumen del suero inicial en la UF.

V₂ = Volumen final en la UF

2.3 Encapsulación de la biomasa de *Bacillus subtilis*

En esta etapa se encapsuló la biomasa de *B. subtilis* para su aplicación en la hidrólisis de las proteínas del suero lácteo, con el objeto de mejorar el proceso enzimático y evaluar su reuso en diferentes ciclos de hidrólisis.

Para llevar a cabo esta prueba se consideraron tres etapas: 1) Propagación y preparación de biomasa de *B. subtilis*, 2) encapsulación de biomasa del *B. subtilis* en diferentes polímeros compósitos y 3) caracterización de los sistemas de encapsulación. A partir de esta etapa, se seleccionaron las cápsulas más adecuadas para este propósito.

2.3.1 Propagación y preparación de biomasa de *B. subtilis*

Para llevar a cabo la propagación del *B. subtilis*, se sembró el microorganismo en una placa Petri en un medio de cultivo sólido, agar de soya tripticaseína, para este fin se utilizó el método de siembra por estría en placa. El *B. subtilis* fue incubado a 37 °C durante 24 h. La figura 2.2 muestra una caja Petri con *B. subtilis*.

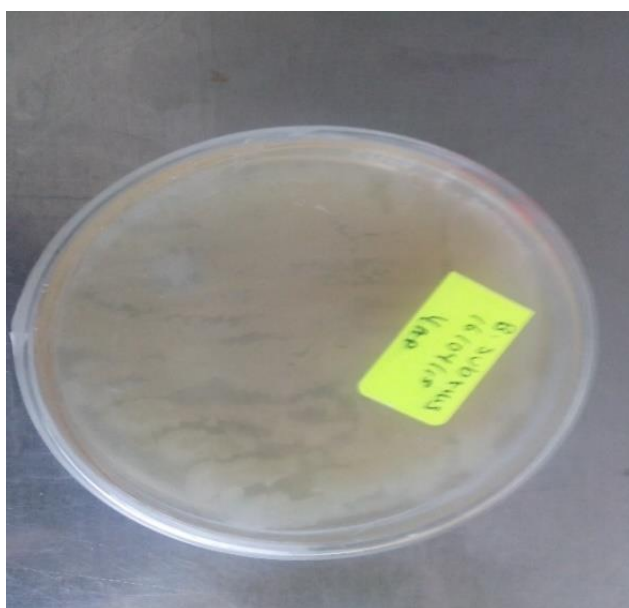


Figura 2.2 Caja Petri con *Bacillus subtilis*

La biomasa suspendida fue preparada en un matraz estéril en el cual se vació el contenido de una placa Petri seccionada en cuadros de aproximadamente un cm², se le agregaron 100 mL de suero lácteo previamente filtrado con agitación suave. Posteriormente fue colocado en un agitador orbital a 100 rpm y 37 °C durante 24 h. La figura 2.3 muestra la biomasa suspendida de *B. subtilis*.

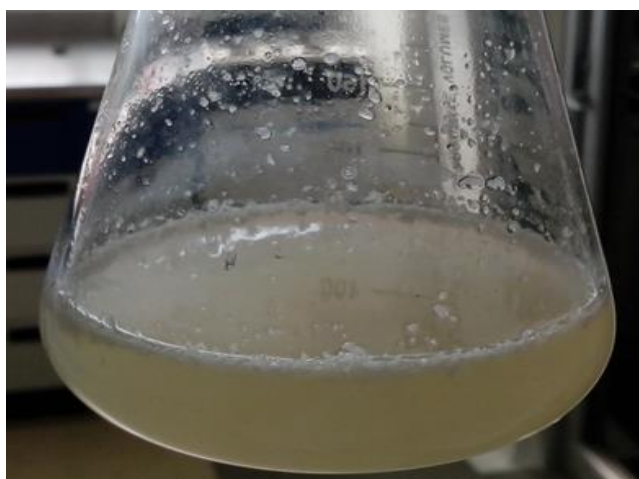


Figura 2.3 Biomasa suspendida de *B. subtilis*

2.3.2 Encapsulamiento de *B. subtilis*

Con la finalidad de obtener matrices de encapsulación adecuadas para inmovilizar la biomasa bacteriana de *B. subtilis* y llevar a cabo la hidrólisis de los concentrados proteicos, se procedió a preparar matrices poliméricas de encapsulamiento, se evaluaron diferentes materiales y técnicas para obtener esferas resistentes a temperaturas de 50 °C, con agitación de 200 rpm y a pH básico que corresponde al pH en que actúan las enzimas del microorganismo.

Los materiales utilizados para la preparación de las matrices de encapsulación fueron alginato de sodio y quitosano, a las cuales se les adicionó un material

complementario como sílica gel, sílica coloidal, carboximetilcelulosa, glutaraldehído y polietilenglicol.

El alginato de sodio se utilizó al 3 % (p/v) en agua y el quitosano al 1 % agregado en la solución del alginato. En esta mezcla se incorporó el material complementario para obtener los compósitos de cada uno de ellos. Una vez obtenida la mezcla, en condiciones asépticas, se adicionaron 10 mL de biomasa suspendida de *B. subtilis* y se homogenizó mediante agitación suave.

Posteriormente, la mezcla fue goteada, en la solución de cloruro de calcio, para formar esferas de encapsulamiento. Las esferas se dejaron reticular durante 24 horas, se lavaron con agua destilada y conservaron en refrigeración a 4 °C.

En el caso de las esferas recubiertas de quitosano, éstas se sumergieron en 100 mL de solución de quitosano con agitación suave durante 40 minutos. Los encapsulados recubiertos fueron lavados y guardados en agua a 4 °C.

2.3.3 Caracterización de los sistemas de encapsulación de *B. subtilis*

Las esferas de encapsulamiento se caracterizaron mediante tres pruebas: 1) resistencia mecánica, 2) análisis FT-IR y 3) determinación morfológica y tamaño de poro. A continuación, se describe el método utilizado para cada prueba.

1) Para la resistencia mecánica 100 esferas de alginato y quitosano fueron sometidas a condiciones similares a las que sufrirán durante su uso en la hidrólisis de proteínas del suero, se consideraron la deformación y/o fractura de las esferas, así como el desprendimiento de material de las mismas debido a su permanencia en 200 mL de agua, a 50 °C y 200 rpm en agitación, durante 7 días.

Al finalizar el tiempo de prueba, las esferas fueron filtradas y observadas con el fin de separar aquellas que se mantuvieron sin deformarse, que fueron resistentes a la ruptura y no presentaron desprendimiento de material durante la agitación. Las matrices que cumplieron estas propiedades fueron seleccionadas para realizarles otras pruebas de caracterización y de reúso en la hidrólisis.

2) Análisis FT-IR. A las matrices con las mejores propiedades mecánicas fueron seleccionadas de la prueba anterior. Se les realizó un análisis IR en un equipo varian FT-IR spectroscopy, a fin de verificar la integridad de las matrices mediante la identificación de los grupos funcionales de cada material utilizado en la preparación de éstas. Para llevar a cabo el análisis se colocó una pequeña cantidad de material seco en el porta-muestras y se le hizo incidir el haz del infrarrojo para generar el espectro correspondiente en un intervalo de longitud de onda de 2.5-16 μm y se midió en % de transmitancia.

Para este análisis, se tomó de 5-10 g de muestra de esferas tratadas previamente mediante deshidratación y trituración en un mortero hasta obtener un polvo fino. Se colocó una pequeña cantidad de cada muestra en el porta-muestras propio del equipo y se procedió al análisis. En la figura 2.4 se presenta el equipo y algunas muestras de prueba.

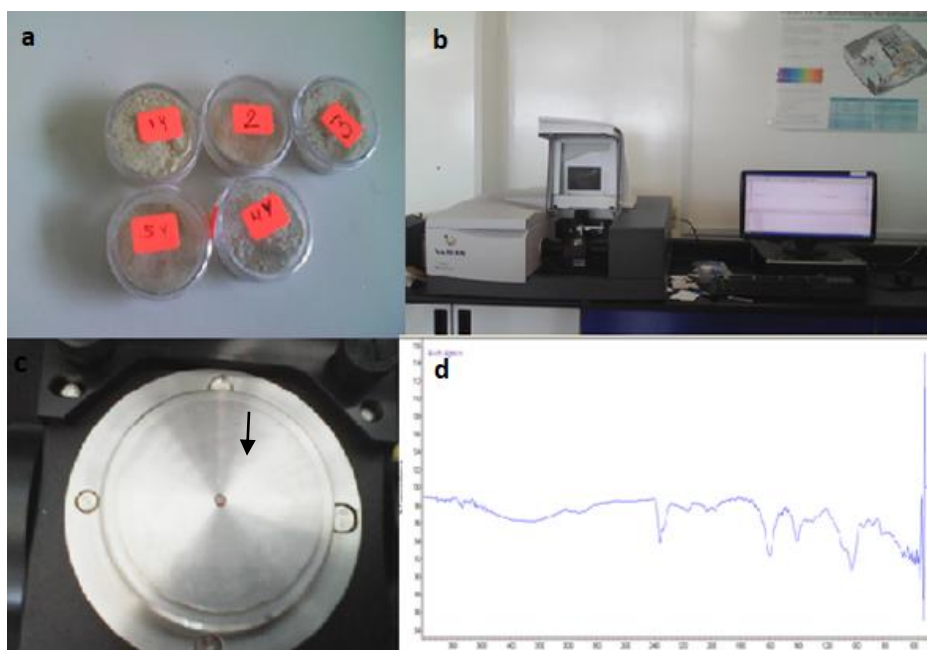


Figura 2.4 a) Muestras, b) equipo para el análisis de FT-IR, c) porta muestras d) espectro de transmisión de quitosano por FT-IR.

3) Análisis morfológico. El análisis morfológico de las esferas se realizó mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM) con un equipo marca jeol

modelo JSM-6610LV mostrado en la figura 2.5. Para llevar a cabo el análisis en el SEM, se tomaron pequeñas cantidades de muestra que equivalen a 3-4 g de esferas, las cuales fueron previamente deshidratadas en una mufla a 100 °C durante 40-50 minutos. Unas esferas de cada tipo fueron adheridas con cinta de carbono doble cara sobre el porta muestras circular propio del equipo.



Figura 2.5. Microscopio electrónico de barrido

Con la finalidad de determinar las dimensiones del poro de las esferas, éstas fueron también sometidas a un análisis mediante la técnica BET, con un sortómetro BELSORP-max marca BEL Japan, Inc. mostrado en la figura 2.6.

Para el análisis en el BET, se tomaron 3-4 g de esferas, también previamente deshidratadas en una mufla a 100 °C durante 40-50 minutos. Las esferas fueron pretratadas a una temperatura de 80 °C durante 22 horas para retirar la humedad. Posteriormente, las celdas fueron ubicadas en la parte superior del sortómetro y la cámara de inundación fue provista de nitrógeno líquido. La cámara de inundación cubrió las celdas y las esferas con N₂, por un periodo de 11 a 12 horas. La interface mediante una gráfica del equipo mostró los resultados del análisis.

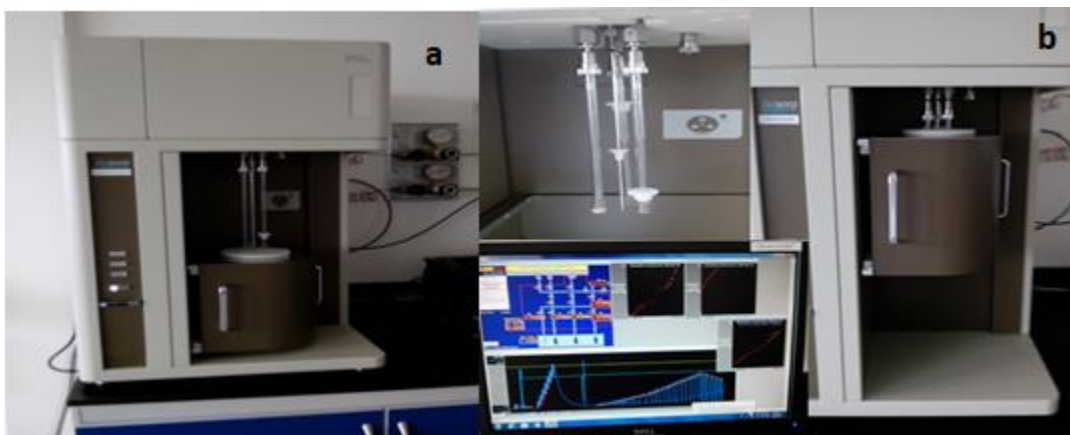


Figura 2.6 a) Sortómetro BELSORP-max, b) posición de las celdas en el sortómetro y gráficas de adsorción y desorción de nitrógeno mostradas por el equipo

2.4 Hidrólisis del concentrado de proteínas con biomasa encapsulada de *B. subtilis*

Para llevar a cabo la hidrólisis, se tomaron cuatro muestras de concentrados de proteínas de 100 mL y se colocaron en un matraz. A cada matraz se le adicionó 20 g de cápsulas de biomasa contenida en cada compósito. Como blanco se utilizó, suero, y como testigo se utilizó una muestra de suero y concentrado de proteínas con biomasa libre de *B. subtilis*. Por cada 100 mL de muestra se utilizaron 10 mL de biomasa de *B. subtilis* o para el caso de biomasa encapsulada. Los matraces preparados se taparon y se colocaron en un agitador orbital a 200 rpm y 50 °C, durante 8 h, como se muestra en la figura 2.7. En ese tiempo se tomaron muestras a cero, 2, 4, 6 y 8 horas. Al finalizar el tiempo establecido, cada muestra se centrifugo durante 15 min a 5000 rpm.

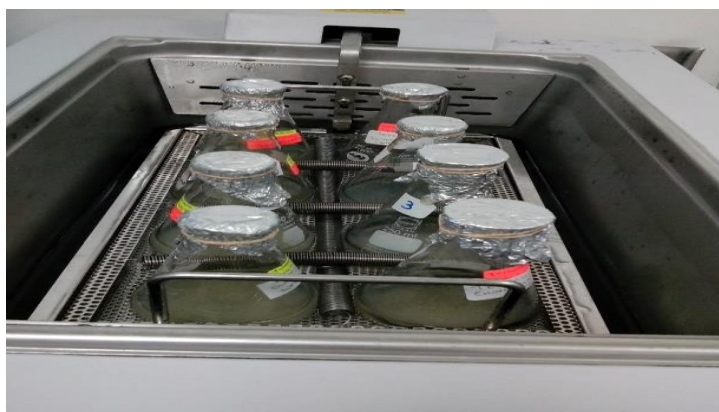


Figura 2.7 Hidrólisis del suero utilizando *B. subtilis*

Una vez concluido el tiempo de hidrólisis, los encapsulados de microorganismos fueron lavados y almacenados en agua a 4 °C para las pruebas de su posterior uso y determinación de ciclos de reúso. Como datos de éste experimento se obtuvo el porcentaje de hidrólisis y el peso molecular de proteínas presentes en los hidrolizados por electroforesis (SDS-PAGE).

2.4.1 Determinación del grado de hidrólisis de los concentrados proteicos

El grado de hidrólisis de los concentrados de proteínas, se determinó mediante la cuantificación de proteínas presente en el sobrenadante obtenido de cada muestra durante el periodo de dicha hidrólisis. Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Biuret con distintos factores de dilución (FD) de 5,10 y 20, con base en la curva patrón de BSA ya descrita en el punto 2.1. Con los datos registrados de concentración de proteínas se calculó el porcentaje del grado de hidrólisis mediante la ecuación 2.7.

$$GH = \frac{(C_0 - C_f)(100)}{C_0} \quad (2.7)$$

GH = Grado de hidrólisis en %

C_o = Concentración inicial de proteínas.

C_f = Concentración de proteínas en el sobrenadante

2.4.2 Determinación de pesos moleculares de hidrolizados de concentrados proteicos

Con el fin de identificar las proteínas contenidas en los hidrolizados de concentrados se utilizó el método SDS-PAGE, descrito por Laemmli (1970), en presencia de dodecil sulfato sódico. Para ello se prepararon dos geles de poliacrilamida con diferente tamaño de poro: el gel de separación tiene una concentración del 10 % de poliacrilamida y el gel de empaquetamiento una concentración del 4 % de poliacrilamida. Para la preparación del gel de separación, los reactivos correspondientes dados en la tabla 2.2, se suministraron a un matraz por las paredes. Una vez que se agregaron los 3 primeros reactivos, se eliminaron las burbujas de aire con un sonicador, se agregó a la mezcla el persulfato de amonio al 10 % y el tetrametiletilendiamina (TEMED). La mezcla se agitó ligeramente y se colocó en las placas de vidrios del equipo Thermo Scientific modelo P8DS. Se dejó que la mezcla gelificara durante 30 minutos.

Tabla 2.2. Volumen de los reactivos para la preparación de geles de poliacrilamida, separación y empaquetamiento

Reactivo	Gel de separación al 10 % (mL)	Gel de empaquetamiento al 4 % (mL)
Agua desionizada	4	3
Poliacrilamida al 30 %	3.33	0.7
Buffer Tris	2.5 (pH 8.8)	1.25 (pH 6.8)
DSS 10 %	0.100	0.050
TEMED	0.010	0.005
Persulfato de amonio al 10%	0.050	0.035

De la misma forma, se preparó el gel de empaquetamiento, siguiendo los mismos pasos que para el gel de separación, en el cual se asentó cuidadosamente el peine para formar los pocillos en donde se colocarán posteriormente las muestras.

En la preparación de las muestras se utilizaron tubos eppendorf en los cuales se vertieron 40 μ L de muestra y 20 μ L de una solución buffer 4x para proteínas el cual fue preparado como se muestra en la tabla 2.3.

Tabla 2.3 Preparación de solución buffer de la muestra 4x para proteínas

Reactivo	Volumen en (mL)
Buffer Tris 0.5M, pH 6.8	2.5
DSS 10 %	2.5
2-Mercaptoetanol	2.5
Glicerol	2.5
Azul de bromofenol	1mg

Las muestras se vaciaron en los pocillos formados en el gel de empaquetamiento para su corrimiento junto con el marcador estándar de proteínas benchMark Proteins Ladder proporcionado por Invitrogen con peso molecular de 10-250 kDa.

Para el corrimiento de las proteínas se colocó el portaplacas de los geles de poliacrilamida en la cámara del equipo con solución buffer de electroforesis tris-glicina, se conectaron los electrodos a la fuente de poder aplicando un voltaje de 100 V como se muestra en la figura 2.8.



Figura 2.8 a) Muestras, b) equipo de electroforesis, c) corrimiento de las proteínas y tinción

Al concluir la corrida, los geles se retiraron de los vidrios y se prosiguió a la tinción. Las soluciones de tinción y desteñido se prepararon como se muestra en la tabla 2.4. Se adicionó 0.05 g de azul de coomasie en el caso de la solución de tinción

Tabla 2.4 Preparación de los reactivos de tinción y destinción

Reactivo	Solución de tinción (mL)	Solución de desteñido (mL)
Ácido acético	10	21
Agua desionizada	40	264
Metanol	50	15
Total	100	300

Se colocaron los geles en un recipiente con solución de tinción durante 3 horas en agitación a 100rpm. Por último, los geles se lavaron por dos horas en agitación sumergidos en solución de desteñido para lograr su revelado.

2.4.3 Determinación de ciclos de reúso de encapsulados en la hidrólisis de los concentrados de proteínas

En esta etapa se determinaron los ciclos de uso de los encapsulados en *B. subtilis*. La hidrólisis del suero lácteo se llevó a cabo con los mismos encapsulados, a fin de determinar cuántos ciclos se pueden llevar a cabo con un mismo encapsulado. En cada ciclo se determinó la resistencia mecánica de los encapsulados y su efectividad para realizar la hidrólisis. Como referente se tomaron 5 ciclos.

La hidrólisis del suero lácteo se llevó a cabo como se indicó en el apartado 2.4, a 2, 4, 6 y 8 horas de hidrólisis para completar un ciclo. Al término de éste, las esferas fueron recuperadas, lavadas con agua destilada estéril y utilizadas nuevamente. Este proceso se efectuó durante cinco ciclos, o bien se detuvo, si las esferas sufrieron daños, como roturas, o bien que disminuyera la actividad proteolítica del microorganismo medido por el grado de hidrólisis obtenido.

2.5 Obtención de fracciones peptídicas activas de hidrolizados por membranas de nanofiltración

En esta etapa se utilizó un proceso de Nanofiltración (NF) para fraccionar los hidrolizados de proteínas. Para ello se utilizaron 500 mL de hidrolizados previamente seleccionados de acuerdo al grado de hidrólisis obtenido. El hidrolizado fue centrifugado y filtrado con filtros de 0.45 μm (Millipore). La membrana utilizada fue de NF, material polisulfona, con un corte de peso molecular de 3kDa. Durante la operación de NF se recolectó el concentrado o retenido y el filtrado o permeado. Las condiciones del proceso fueron: temperatura ambiente (22-23 °C), pH de 6.7, presión de entrada de 0.3 Kf/cm² y presión de salida 0.5 Kf /cm².

2.5.1 Determinación del peso molecular de las fracciones peptídicas mediante SDS-PAGE

Con el fin de identificar las proteínas contenidas en las fracciones peptídicas de los hidrolizados de acuerdo su masa molecular, se utilizó el método SDS-PAGE, descrito en este documento en el apartado 2.6.2.

2.5.2 Determinación del perfil de aminoácidos de las fracciones peptídicas mediante HPLC

Para el análisis de los productos derivados del proceso de NF se utilizó cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en un cromatógrafo de líquidos Waters1525. El procedimiento fue el siguiente: en la columna Hi-Pore RP-318, de dimensiones 250 x 4.6 mm (Bio-Rad), se inyectaron 50 μL de muestra con una concentración de 2 mg/mL, la cual fue previamente filtrada con filtros millipore (0.45 μm). Las fases móviles A y B fueron mezclas de agua y ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1 % y acetonitrilo y TFA (0.1 %), respectivamente. El flujo fue de 1 mL/minuto.

El gradiente fue lineal del 0 al 50 % del solvente B en 60 minutos. La detección se llevó a cabo en un UV vis a 214 y 280 nm.

2.6 Determinación de la actividad inhibitoria de la ECA de los productos obtenidos

La actividad inhibitoria de la ECA se determinó de acuerdo con el método descrito por Cushman y Cheung (1971) con alguna modificación como se describe en las siguientes etapas.

a) Preparación del Histidil-Hipuril-Leucina (HHL), sustrato de la ECA. 54mg de HHL se disolvió en 25 mL de una solución buffer de fosfato de potasio dibásico 0.1 M y cloruro de sodio 0.3 M con pH de 8.3. La concentración final obtenida fue de 5 mM del HHL con pH de 8.3.

b) Preparación de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). 0.5 mg de enzima fue disuelta en 1mL de solución de glicerol al 50 % (v/v).

c) Preparación de las soluciones para la determinación de la inhibición de la ECA (IECA)

- Solución blanco (B). En un tubo para centrifuga se agregaron 100 µL de HHL, 40 µL de muestra y 40 µL de agua destilada. Se preparó una solución blanco por cada muestra cuya actividad inhibitoria se requiere determinar.
- Solución control (C). En un tubo para centrífuga se agregaron 100 µL de HHL, 40 µL de solución buffer y 40 µL de enzima ECA.
- Solución muestra (M). En un tubo para centrífuga se agregó 100 µL de HHL, 40 µL de muestra y 40 µL de enzima ECA. Se preparó una solución para cada muestra en estudio.

d) La reacción de las soluciones se llevó acabo a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente se inactivó la enzima adicionando 150 µL de HCl 1N.

e) Para la determinación del ácido hipúrico se adicionó a cada tubo de las preparaciones anteriores, 1 mL de acetato de etilo, se agitaron en un vortex y se centrifugaron por 10 minutos a 4000 rpm. Se tomaron 750 µL del sobrenadante (fase

orgánica) y se evaporó por calentamiento a 95 °C durante 15 minutos. Al residuo obtenido se le adicionó 2000 µL de agua destilada agitando de forma circular. Por último se midió la absorbancia a 228 nm.

f) El % de actividad inhibitoria se calculó mediante la ecuación 2.8 (Gobbetti *et al.*, 2000).

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(AC-AM)(100)}{AC-AB} \quad (2.8)$$

AC es la absorbancia de la reacción control con ECA, sustrato (100 % de actividad inhibitoria).

AM es la absorbancia de la reacción muestra con ECA, sustrato e inhibidor.

AB es la absorbancia de la prueba blanco con sustrato sin ECA ni inhibidor, 0 % de actividad.

2.7 Encapsulación de fracciones peptídicas

Con la finalidad de establecer matrices de encapsulamiento adecuadas para la protección de las fracciones peptídicas contra procesos de inactivación, se procedió a preparar esferas poliméricas con diferentes materiales. Los materiales utilizados para la preparación de las matrices de encapsulación fue alginato de sodio como base, al cual se le adicionó otro componente como goma arábica, colágeno y gelatina.

El alginato de sodio se utilizó al 1 % (p/v) en agua, sobre el cual se incorporaron los demás materiales para obtener mezclas de distintas características. Una vez obtenida la mezcla fue goteada sobre una solución de lactato de calcio ($C_6 H_{10} Ca O_6$) al 5 % para la formación de matrices esféricas. Se dejaron en agitación suave por 30 minutos y se lavaron para quitar el exceso de lactato.

2.7.1 Obtención del tamaño de poro de los sistemas de encapsulación de las fracciones peptídicas

Con la finalidad de determinar las dimensiones del poro de las esferas, éstas fueron también sometidas a un análisis mediante la técnica BET, con un sortómetro BELSORP-max marca BEL Japan, Inc., descrita en el apartado 2.4 de este trabajo.

2.8 Determinación de la capacidad de liberación de péptidos por los sistemas encapsulantes y su actividad antihiperensiva

La prueba de liberación de péptidos se llevó a cabo en simulación *in vitro*, bajo condiciones gastrointestinales (GI). Para ello se utilizó el método propuesto por Alting *et al.*, (1997) con algunas modificaciones. Las fracciones peptídicas (2 mL) de forma libre y encapsuladas en matrices se incubaron con pepsina (0.06 mg/mL) en 10 mL de una solución acuosa de pH 2 ajustada con HCl 10 N a 37 °C y agitación constante de 200 rpm durante 2 horas, al término de este tiempo se tomaron 2 alícuotas de 1 mL, fueron centrifugadas durante 15 min a 5000 rpm.

El sobrenadante fue analizado por espectrofotometría a 580 nm usando el método de Biuret, para determinar el contenido de péptidos. A la solución restante (10 mL) se le agregó 0.05 mg/mL de tripsina. Se ajustó la solución a un pH de 5-6 con NaHCO₃ 0.1 M y subsiguiente a un pH 7.5 con NaOH 1N a 37 °C y se mantuvo durante 2 h en agitación suave (100 rpm).

Por último, la reacción se finalizó calentando durante 15 minutos en un baño de agua para inactivar la enzima. Las muestras fueron centrifugadas durante 15 min a 5000 rpm. 2 mL del sobrenadante fue analizado por espectrofotometría a 580 nm usando el método de Biuret, para determinar el contenido de péptidos.

Al sobrenadante restante se le midió la actividad inhibitoria de la ECA con el método presentado en el apartado 2.6 de este documento.

3 RESULTADOS

En esta etapa del trabajo se presentan los resultados obtenidos de la caracterización del suero, la concentración de proteínas mediante ultrafiltración y su rendimiento. Además, contempla los resultados sobre la hidrólisis de estos concentrados con sistemas de diferentes matrices de encapsulación de biomasa de *Bacillus subtilis* o enzimas, para lo cual se llevó a cabo previamente una selección de dichas matrices, de acuerdo a sus características físicas y mecánicas, porosidad y tamaño de poro, entre otras. También se reporta la eficiencia del proceso de encapsulación por medio del reúso de los encapsulados a través de su resistencia mecánica y su utilización en los hidrolizados del suero lácteo, la obtención e identificación de fracciones peptídicas activas y su respectivo análisis.

3.1 Caracterización del suero lácteo

Se ilustra en la figura 3.1 el suero lácteo utilizado para esta investigación en presentación de 1 litro. Se observa que el líquido es de color amarillo turbio de buen aspecto, de olor fermentado agradable y sabor fresco débilmente dulce. Los resultados obtenidos de su caracterización se muestran en la tabla 3.1.



Figura 3.1 Suero lácteo

De acuerdo al resultado obtenido, este suero se puede clasificar como suero dulce (SD) ya que predominan los parámetros que lo clasifican en esta categoría tales

como el valor del pH, cantidad de calcio, sólidos totales, cenizas y proteínas como lo reportan trabajos de Miranda *et al.*, (2009) y Panesar *et al.*, (2007). Sin embargo, la cantidad de acidez del suero en estudio muestra la presencia de ácido láctico en mayor concentración, 2.25 g/L, que la reportada para sueros dulces y mucho menor que la reportada para sueros ácidos como se observa en la tabla 3.2, respecto a los trabajos de Miranda *et al.*, (2009), Abaigar (2009), Tovar (2012) y Romero (2014).

Tabla 3.1 Resultados obtenidos en la caracterización del suero lácteo

Parámetros	Suero lácteo
pH	6.2
Acidez (g/L ácido láctico)	2.25
Calcio (g/L)	0.48
Densidad (g/L)	1022
Azúcares reductores (g/L)	23.33
Sólidos totales (mg/L)	62.7
Cenizas (%)	8.29
Proteínas (g/L)	10.18

La cantidad de proteínas contenidas en el suero fue de 10.18 g, valor que coincide con los reportados por otros autores presentados en la tabla 3.2 y mayor que la obtenida por Romero (2014).

Tabla 3.2 Resultados reportados de otros autores de las características de suero lácteo

Autor	Panesar <i>et al.</i> , (2007)		Miranda (2009)		Abaigar (2009)		Tovar (2012)	Romero (2014)	
Tipo de suero	SD	SA	SD	SA	SD	SA	SD	SD	SA
Parámetros									
pH	6.5	>5	6.6	4.2	<6	>4.5	5-6.6	6.7	4.5
Acidez (g/L ácido láctico)			0.08	0.32	0-0.3	7-8		0	10.35
Calcio (g/L)	0.4-0.6	1.2-1.6	0.53	0.51	0.4-0.6	1.2-1.4	0.64	0.25	0.28
Densidad (g/L)								1010	1023
Azúcares reductores (g/L)							48.4	26	38.9
Sólidos totales	63-70	63-70			55-75	55-65		51	86
Cenizas (g/L)					4-6	6-8		4	7.5
Proteínas (g/L)	6-10	6-8	9.6	9.4	9-14	7-12	12.1	3.7	3.3

SD Suero dulce SA suero ácido

3.2 Concentración de las proteínas del suero lácteo utilizando ultrafiltración

En este proceso de separación se obtuvieron dos fracciones el permeado y el concentrado; el permeado fue desechado por no ser requerido para este estudio. El concentrado mostró un color amarillo verdoso y de olor agradable.

3.2.1 Obtención y caracterización del concentrado de proteínas

Los parámetros determinados en esta etapa se muestran cuantitativamente en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Resultados obtenidos de la caracterización del concentrado de proteínas del suero lácteo

Parámetros	Concentrado de proteínas
pH	6.4
Acidez (g/L de ácido láctico)	1.8
Calcio (g/L)	0.2725
Densidad (g/L)	1025
Azúcares reductores (g/L)	11.77
Sólidos totales (g/L)	60.95
Ceniza (%)	3.102
Proteínas(g/L)	8.182

La cantidad de componentes iniciales del suero lácteo se pueden comparar con los obtenidos en el concentrado de proteínas a través del cálculo del rendimiento de los parámetros fisicoquímicos reportados, el cual se presenta a continuación.

Los resultados de la tabla 3.4 muestran la eficiencia en la concentración de los componentes del suero después de haber sido sometido al proceso de UF; estos indican que se obtuvo un rendimiento considerable. Por ejemplo, en el caso de las proteínas como un componente importante para este trabajo, se determinó que aproximadamente el 80 % de ellas fueron retenidas por la membrana utilizada. Otros componentes como el calcio y la lactosa mostraron rendimientos menores, ya que

son partículas de pesos moleculares más pequeños, y fueron separados en la fracción del permeado.

Tabla 3.4. Resumen de resultados del rendimiento del concentrado de proteínas

Parámetros	Suero g/L	Concentrado de proteínas g/L	Rendimiento del concentrado proteico (%)
Calcio (g/L)	0.48	0.2725	56.7
Azúcares reductores(g/L)	23.33	11.77	50.45
Sólidos totales (g/L)	62.7	60.95	97.2
Ceniza (%)	8.29	3.102	37.41
Proteínas (g/L)	10.18	8.182	80.37

Los autores que han trabajado con concentrados proteicos reportan diferentes rendimientos en proteínas, Tovar *et al.*, (2012) en el proceso de UF para el concentrado de proteínas de suero lácteo dulce, reportó el 53 % de rendimiento al usar una membrana cerámica de 15 kDa y 1.5 bar de presión.

Baldasso *et al.*, (2011) encontraron que, mediante el uso de suero dulce, se puede alcanzar aproximadamente 42 % y 35 % de rendimiento de proteína a una temperatura de 50 °C, con una membrana de 10 kDa.

Rektor *et al.*, (2004) desarrollaron un sistema de filtración (UF-NF-OI) para el procesado del suero obtenido de queso mozzarella. La UF retuvo completamente la materia grasa, la retención de proteínas fue del 75 % en NF y la pérdida de lactosa del 41 %, la retención de sales minerales, se complementó con OI.

Cuartas (2005), en su estudio de desmineralización del suero lácteo por NF, utilizó un proceso previo de UF, para concentrar las proteínas del lactosuero dulce, en donde reporta un rendimiento del 78 % de proteínas y 13 % de lactosa, con una membrana de polietersulfona a 16 °C, pH de 6.1 y (0.3-0.6) mPa de presión.

La diferencia de estos rendimientos se puede adjudicar a las condiciones utilizadas en el proceso o el tipo de membrana utilizada. Sin embargo, todos los estudios revelan que los procesos de membranas son eficientes para concentrar las proteínas.

3.3 Encapsulación de biomasa de *Bacillus subtilis*

Como resultado de este experimento se obtuvieron sistemas esféricos de encapsulamiento con 12 materiales compuestos, los cuales se muestran en la figura 3.2. Los materiales compuestos fueron los siguientes: Alginato-Agar (AAG), Alginato- Sílica Coloidal (ASC), Quitosano-Gel de sílice (QS), Alginato-Quitosano (AQ), Alginato-Quitosano recubiertas con Quitosano (AQR), Alginato-Quitosano-Carboximetilcelulosa (AQC) Alginato-Quitosano-Glutaraldehído (AQG), Alginato-Quitosano-Polietilenglicol (AQPEG), Alginato-Quitosano-Óxido de Silicio (AQS), Alginato-Quitosano-Poliamida (AQP), Alginato-Quitosano-Acrilamida (AQA), Alginato-Quitosano-Trietilenglicol (AQT).

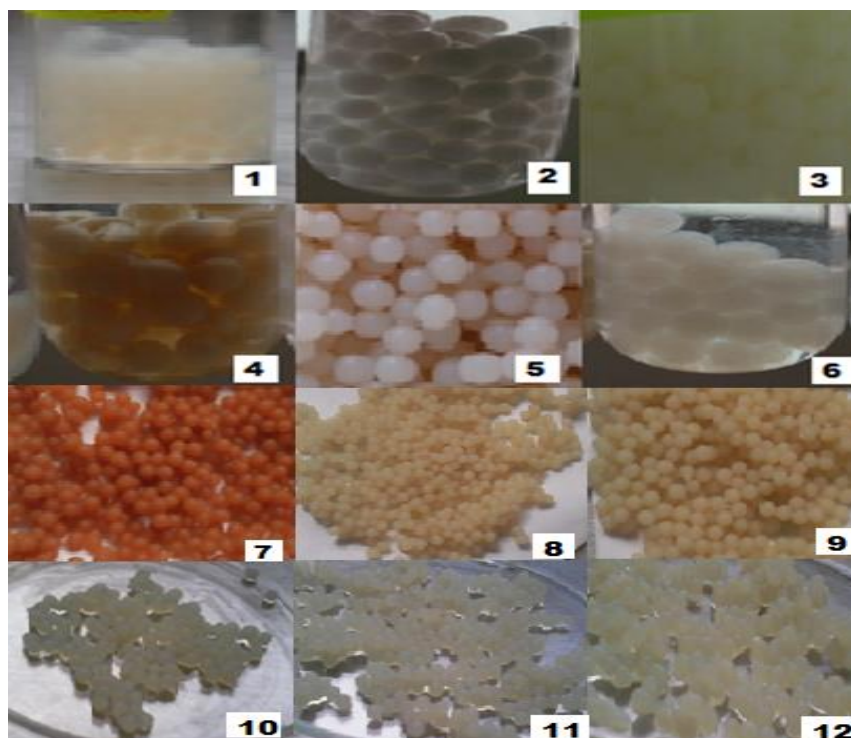


Figura 3.2 Esferas obtenidas con diferentes matrices 1) AAg, 2) ASC, 3) QS, 4) AQ, 5) AQR, 6) AQC, 7) AQG, 8) AQPEG, 9) AQS, 10) AQP, 11) AQA, 12) AQT

Los sistemas de encapsulamiento esféricos presentaron diferente consistencia, coloración y, en algunas veces, dificultad para su mezcla y formación.

3.3.1 Caracterización de los sistemas de encapsulamiento

En este apartado se reportan resultados de la resistencia mecánica, análisis FT-IR, análisis morfológico, determinación del área superficial y dimensiones del poro.

1) Resistencia mecánica

En la tabla 3.5 se presenta el resultado de las pruebas de resistencia mecánica de los encapsulados.

Tabla 3.5 Características de resistencia mecánica obtenidas para diferentes sistemas de encapsulación

Sistemas de encapsulación		Resistencia a la temperatura y agitación	Desprendimiento de material	Hinchamiento
1	AAg	NO	NO	SI
2	ASC	SI	NO	SI
3	QS	NO	NO	NO
4	AQ	SI	NO	SI
5	AQR	SI	NO	NO
6	AQC	NO	NO	NO
7	AQG	SI	NO	NO
8	AQPEG	SI	NO	NO
9	AQS	SI	NO	NO
10	AQP	SI	SI	NO
11	AQA	SI	SI	NO
12	AQT	NO	NO	NO

En esta tabla se reportó que solo 4 de los sistemas de encapsulación presentaron fallas por resistencia mecánica al exponerse a temperatura de 50 °C y agitación de 200 rpm. Estas fallas fueron debido a desprendimiento de material. Es decir, si se rompió la esfera o sufrió alguna deformación durante la prueba. Los resultados encontrados permitieron seleccionar 4 matrices denotadas por AQG, AQPEG, AQS y AQR que fueron sometidas a los siguientes análisis de caracterización FT-IR, morfológico, área superficial y dimensión de poro.

2) Análisis de FT-IR

En la figura 3.3 se muestran los espectros del alginato sódico y quitosano, así como las diferentes formulaciones que constituyen las matrices en estudio, AQG, AQPEG, AQS y AQR. De los espectros, se puede observar que todos presentan bandas características de alginato sódico y del quitosano, debido a que son los principales constituyentes o matriz base de los encapsulados.

Las bandas del alginato se pueden asociar a la vibración de tensión O-H (3250 cm^{-1}) vibración de tensión asimétrica y simétrica del COO^- ($1593\text{-}1404\text{ cm}^{-1}$) y la banda de C-O-C de ($960\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$) como lo muestra (Rizzo *et al.*, 2008; Das *et al.*, 2010; Saha y Ray 2013; Chandrasekar *et al.*, 2017).

En el quitosano se observa el estiramiento de O-H (3414 cm^{-1}) la banda de C-H (1664 cm^{-1}) el grupo -NH_2 aparece en (3215 cm^{-1}), la vibración de tensión de C-N aparece a (1316 cm^{-1}) y el estiramiento C-O-C glucosídico se observa en las frecuencias de ($894\text{-}556\text{ cm}^{-1}$).

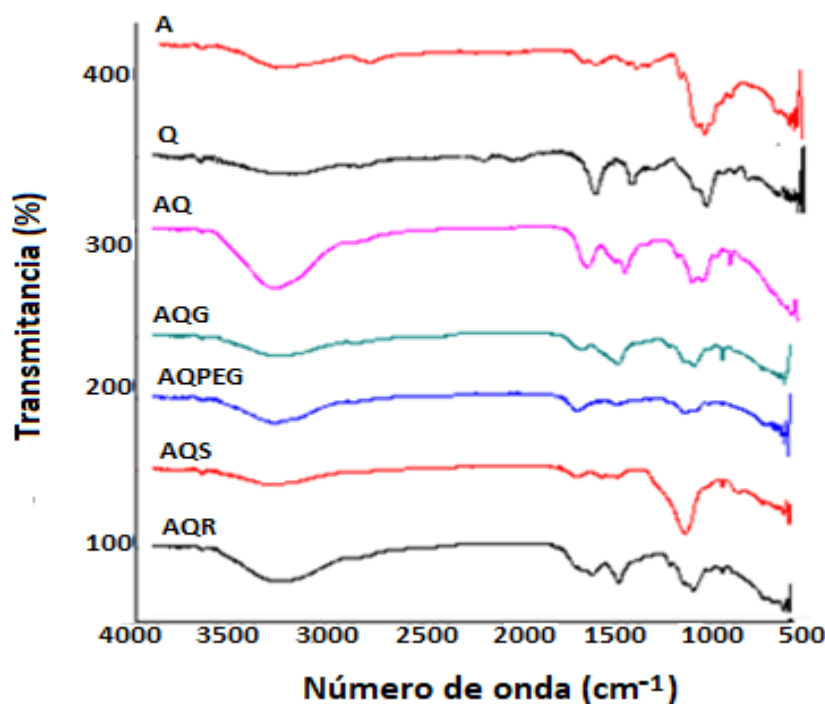


Figura 3.3 Espectroscopia comparada del FT-IR de las diferentes formulaciones con mezcla física de los sistemas de encapsulación

En estos resultados se destaca también que los encapsulados estudiados conservaron las bandas características del alginato y quitosano, lo cual significa que durante la preparación de los encapsulados esféricos no hubo cambios químicos en los polímeros constituyentes.

Otros estudios de FTIR como los de Lee *et al.*, (2000), Cardona *et al.*, (2013), Macea (2015) y Baysal *et al.*, (2013), reportan espectros IR similares de quitosano y alginato.

3) Análisis de SEM

Los resultados obtenidos por SEM con ampliaciones de 50X (columna izquierda), 500X (columna central) y 2000X (columna derecha), se muestran en la figura 3.4. En las micrografías se observa que la matriz ASC presenta gránulos visibles de material en la superficie de la esfera, posiblemente por la diversidad del material y su no homogenización en la mezcla, ya que se presentaron grandes dificultades de incorporación. En la matriz de AQR se observa que la esfera presenta poros de varios tamaños, superficie rugosa con grietas, también se observa que la distribución de sus componentes se presenta más uniforme que en la micrografía anterior y por tanto, es notoria su porosidad. En la micrografía de AQC se observan gránulos de carboximetilcelulosa adheridos a la esfera, por lo que también en este caso se considera que los componentes no se encuentran distribuidos de manera uniforme y la porosidad es poco perceptible.

En la figura 3.5 se muestran las micrografías de las matrices de AQG, AQPEG y AQS, en las cuales se observa una dispersión más homogénea en el material, al igual que la distribución de poros.

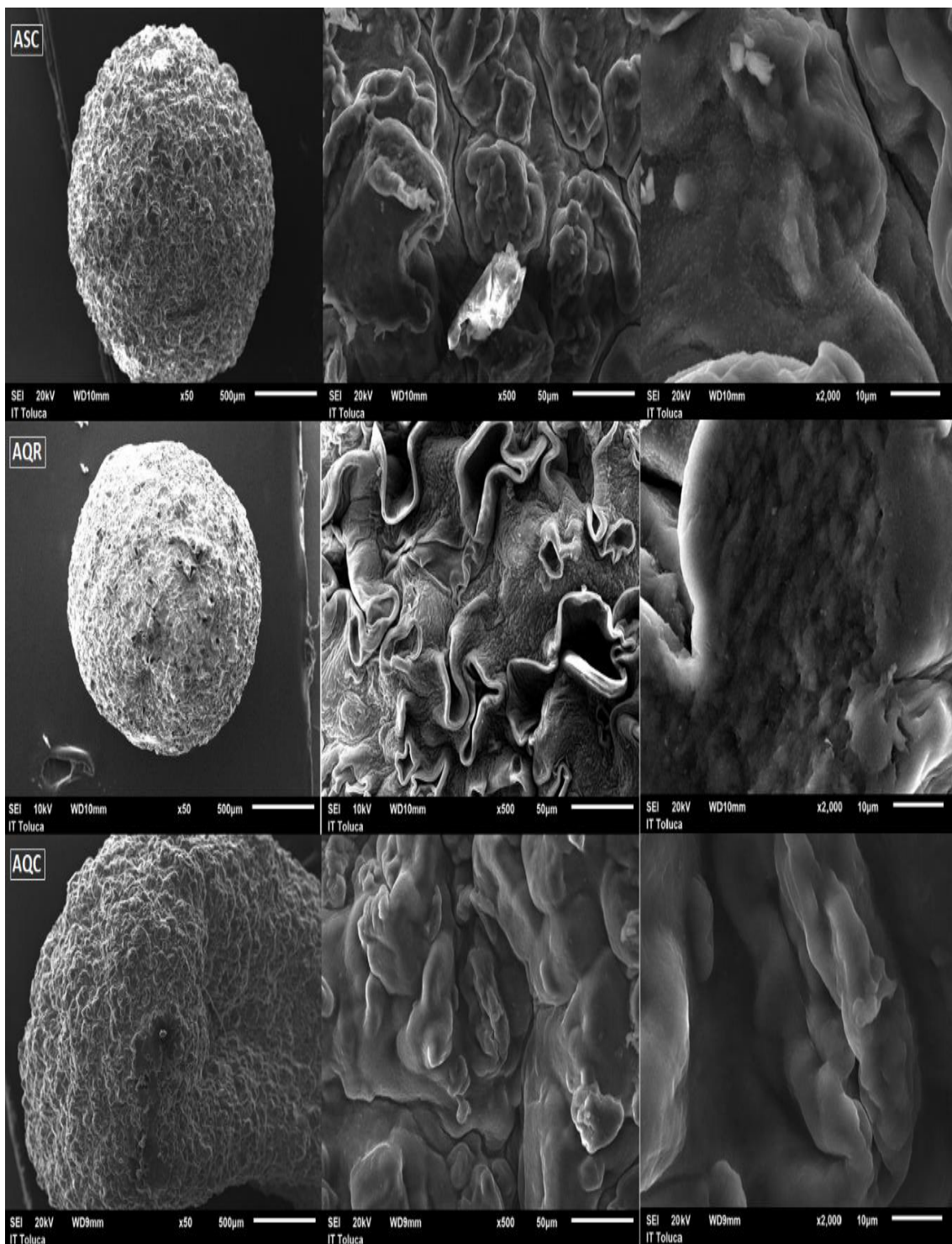


Figura 3.4 Micrografías obtenidas en el SEM con ampliaciones por columna de 50X, 500X y 2000X de izquierda a derecha. Por renglón las matrices formadas de (ASC), (AQR) y (AQC)

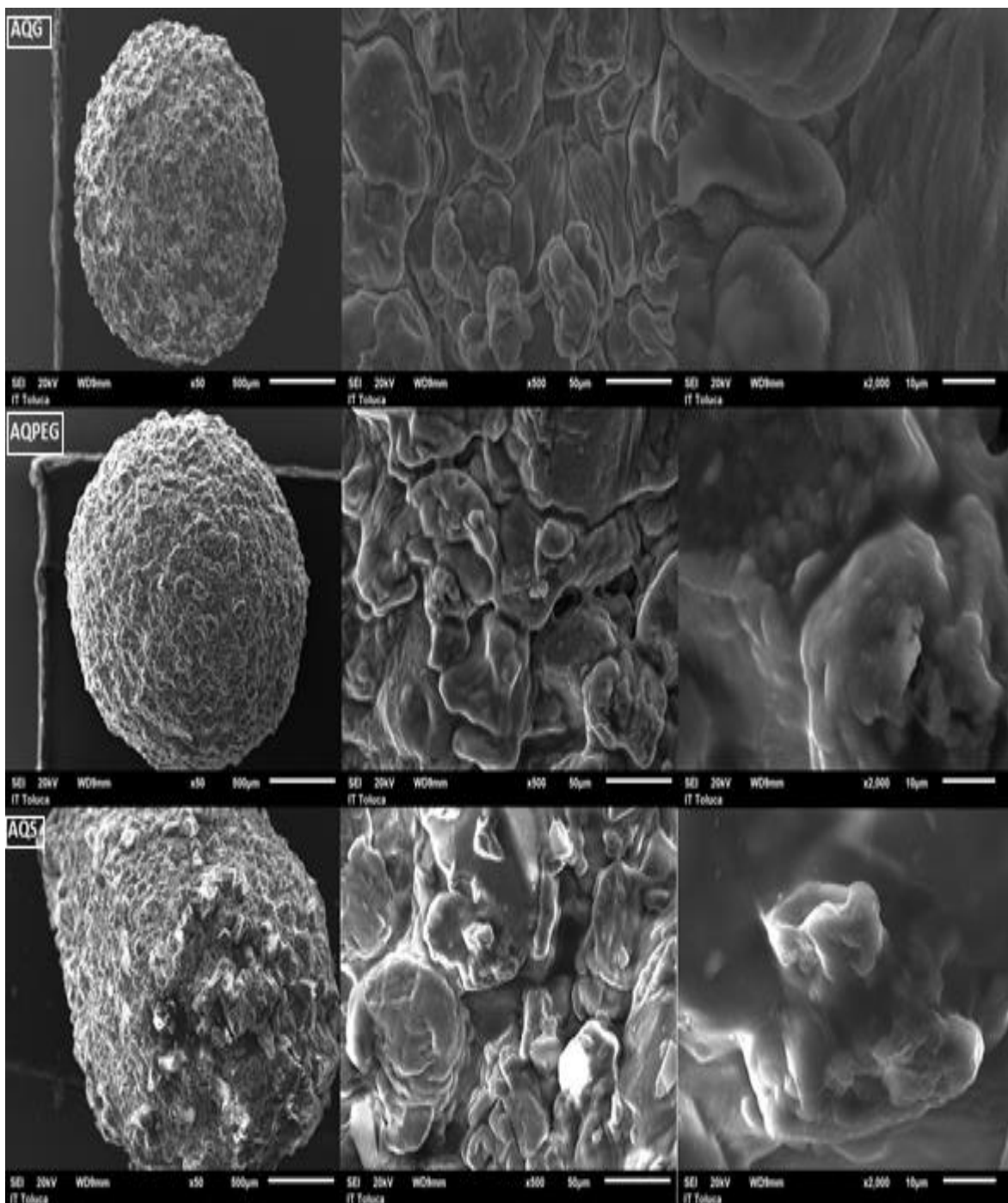


Figura 3.4 Micrográficas obtenidas en el SEM con ampliaciones por columna de 50X, 500X y 2000X de izquierda a derecha. Por renglón las matrices formadas de (AQG), (AQPEG) y (AQS)

De acuerdo a lo anterior, las matrices seleccionadas para la siguiente etapa fueron aquellas que mostraron mejor uniformidad en la dispersión del material, presentaron poros visibles, mayor homogeneidad de material (no presentan material disgregado en la superficie), ya que el hecho de que los materiales no se encuentren homogenizados o bien incorporados en la matriz, indica que ésta es susceptible a su desprendimiento, lo que implica una pobre resistencia mecánica en alguno de los ciclos de uso para la hidrólisis del suero.

4) Análisis de BET

Por otro lado, los resultados obtenidos del equipo BET de medición de área superficial, volumen de la esfera, volumen y diámetro del poro de las matrices de prueba, se muestran en la tabla 3.6.

Tabla 3.6 Características superficiales de las esferas y del poro

		Área superficial de la esfera (m ² /g)	Volumen de la esfera (cm ³ /g)	Volumen del poro (cm ³ /g)	Diámetro del poro (µm)
1	ASC	4.45	10.23	0.14380	0.01290
2	AQR	0.045	0.010	0.00015	0.01378
3	AQC	1.93	0.447	0.0031	0.00649
4	AQG	0.29	0.067	0.00035	0.00472
5	AQPEG	0.39	0.089	0.00045	0.00464
6	AQS	78.9	18.47	0.2809	0.01423

De los resultados obtenidos se observa que las matrices que presentan mayor diámetro de poro son las 1, 2 y la 6. En lo que se refiere al área superficial, la matriz 6 también destaca por presentar una mayor área, lo cual se puede atribuir a una deformación de la matriz, debido a que las micrografías correspondientes muestran heterogeneidad en sus componentes. Las matrices restantes se encuentran en un rango de área superficial entre 0.3-4.4 m²/g.

Cabe mencionar que las matrices que contienen sílice, 1 y 6: ASC y AQS, son difíciles de homogenizar y se dificulta su goteo para la formación de esferas, lo cual pudiera explicar los resultados anteriores.

Respecto a los otros parámetros, también se observa inconsistencia en los datos en esas mismas matrices, por lo que se confirma que el componente disgregado afecta la determinación de las dimensiones del poro y el área superficial de la matriz. Por tanto, las matrices que tuvieron un comportamiento similar y datos de dimensión de poro congruentes fueron la 4 y 5: AQG y AQPEG, estos resultados se pueden explicar debido a que tanto el glutaraldehído como el polietilenglicol son compuestos que retículan al quitosano proporcionando una mayor resistencia mecánica debido a los enlaces iónicos y covalentes que se forman entre ellos.

Por otra parte, las matrices que se obtuvieron fueron matrices mesoporosas de acuerdo a su diámetro del poro ya que tienen un diámetro entre 0.002-0.050 μm . Esta característica es importante para la selección de las matrices de encapsulamiento en la inmovilización de las bacterias, ya que el diámetro de la esfera (0.00464-0.014 μm) es menor que el tamaño de la bacteria (1-3 μm de longitud y 0.6 μm de altura) y las enzimas de 0.01-0.1 μm , lo cual permite que la bacteria sea retenida en el interior de la matriz.

A partir del resultado anterior, únicamente se seleccionó el sistema encapsulante AQPEG de *B. subtilis* para llevar a cabo la hidrólisis, ya que ofrece diámetros de poro y área superficial congruente, su morfología es uniforme y presentó una resistencia mecánica adecuada, acorde a las condiciones estudiadas. En la figura 3.6 se muestra una imagen de capsulas de AQPEG.



Figura 3.6 *B. subtilis* inmovilizado en matriz de AQPEG

Resultados semejantes fueron reportados por Baysal *et al.*, (2013) el cual obtuvo hidrogeles de alginato quitosano para el desarrollo y proliferación de células, Taqieddin y Amiji (2004), inmovilizaron la enzima β -galactocidasa en esferas de alginato quitosano para mantener su estabilidad, Wang *et al.*, 2011 encapsuló en matrices de alginato quitosano la glucosa oxidasa (GOX) con una alta eficiencia de encapsulación y retuvo su actividad durante dos meses de encapsulación. Takka y Gürel (2010), evaluaron matrices de alginato quitosano y lo propusieron como opción en la liberación de proteínas.

3.4 Hidrólisis del concentrado de proteínas con biomasa bacteriana encapsulada

En esta sección se presentan los resultados de porcentaje de hidrólisis contra tiempo para los concentrados proteicos y el análisis de electroforesis de los hidrolizados.

3.4.1 Obtención del grado de hidrólisis de los concentrados de proteínas

En la figura 3.7 se presentan la cinética del grado de hidrólisis del concentrado de proteínas con *B. subtilis* para diferentes experimentos a) biomasa libre en suero lácteo (BLs) como blanco, b) biomasa libre en concentrado de proteínas (BLc), c) biomasa encapsulada en AQPEG en suero lácteo como blanco (BEs) y d) biomasa encapsulada en AQPEG en concentrado de proteínas (BEc).

En los resultados obtenidos se observaron valores cercanos al 20 % de hidrólisis a las 2 horas en las muestras de BLs, BLc y BEs y del 9 % en el BEc. Con respecto a las 4 horas de hidrólisis, se observa que la biomasa libre causó de 30 a 50 % de hidrólisis, mientras que encapsulado fue de 17 % y 30 % para concentrado y suero respectivamente. En este caso se observa un promedio de porcentaje de hidrólisis de 40 %. Para las seis horas, es notorio que la biomasa encapsulada para los

concentrados de proteínas tiene un efecto similar que en forma libre ya que alcanzó un promedio de 43 %. En un tiempo de 8 horas, todas las muestras presentan aproximadamente el 70 % de hidrólisis, independientemente del uso de biomasa libre o encapsulada. Finalmente, a las 24 horas el máximo porcentaje de hidrólisis resultó de 85 % con *B. subtilis* libre en concentrados de proteínas seguido por 83 % de *B. subtilis* encapsulado con el mismo sustrato. Estos resultados muestran que a partir de las seis horas de hidrólisis el *B. subtilis* encapsulado actúa de manera semejante que, en forma libre, por lo que se considera que el encapsulamiento no afecta su actividad catalítica.

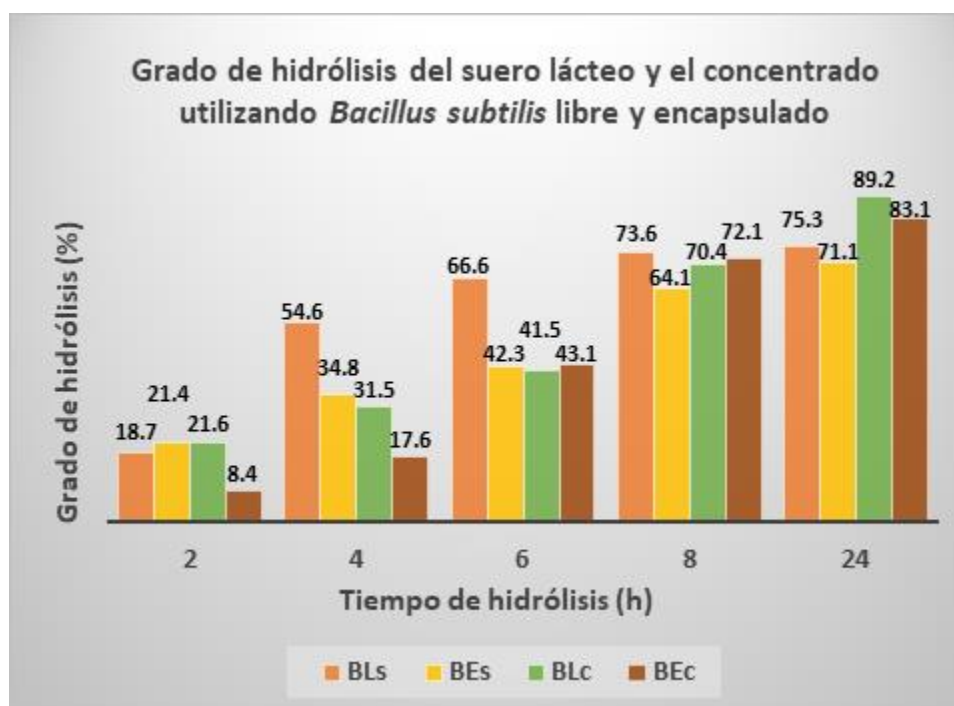


Figura 3.7 Grado de hidrólisis del concentrado del suero lácteo obtenido con *B. subtilis* libre (BL) y encapsulado (BE)

De los hidrolizados obtenidos se seleccionaron los de seis horas, debido a que se presentó un comportamiento similar en microorganismo encapsulado y libre, además de considerar que a las 8 y 24 horas los hidrolizados podrían contener fracciones peptídicas degradadas.

El porcentaje de hidrólisis obtenido con el *B. subtilis* es semejantes al reportado por Harriman *et al.*, (2013). Estos autores encontraron 44.7 % de hidrólisis en concentrados de proteínas de suero lácteo en cinco horas, con *Aspergillus Sojae* y *Bacillus licheniformis*. Spellman *et al.*, (2003) obtuvo un grado de hidrólisis de 20 % con la enzima Debitrasa HYW20, en un periodo de incubación de 6 horas, en suero de leche y de 15 % con Alcalasa en el mismo tiempo de incubación. Otros autores como Guo *et al.*,(2009) utilizaron *Lactobacillus Helveticus* LB13, incubado durante 8 horas con lo que obtuvieron un grado de hidrólisis de aproximadamente 20 %.

3.4.2 Obtención de los pesos moleculares de hidrolizados de concentrados proteicos

En la figura 3.8 se muestran los diagramas de electroforesis SDS-PAGE para *B. Subtilis* libre y encapsulado. El marcador (M), el concentrado (C) como testigo y los hidrolizados obtenidos a las 2, 4, 6, 24 horas, con el propósito de observar los pesos moleculares de las proteínas contenidas en cada tiempo, y la posible degradación a las 24 horas.

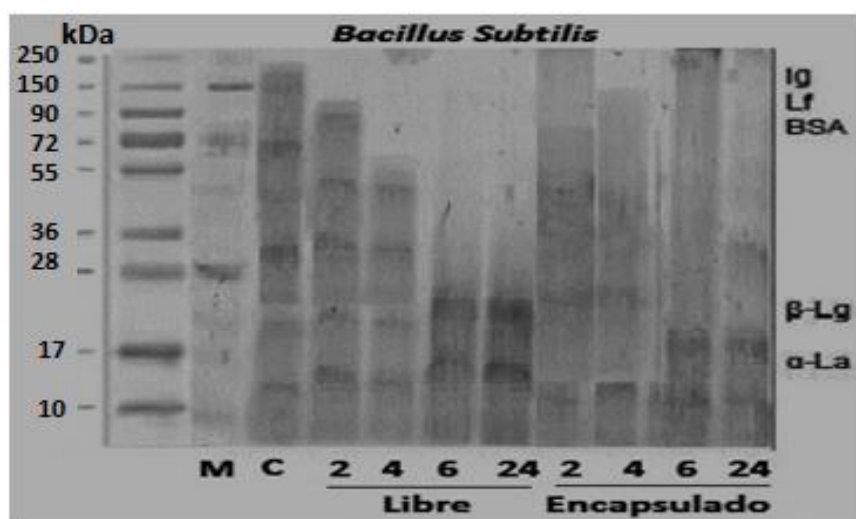


Figura 3.8 SDS-PAGE. Efectos de los hidrolizados del concentrado de proteínas utilizando para su obtención *B. subtilis* libre en y *B. subtilis* encapsulado en matrices de AQPEG.

Los resultados indican que en un tiempo de dos horas de llevar a cabo la hidrólisis del concentrado proteico con *B. subtilis* libre, las proteínas Ig y Lf de peso molecular de 130 kDa y 76 kDa, respectivamente, se degradaron total o parcialmente, el mismo fenómeno se observó con los microorganismos encapsuados.

La proteína BSA de 56 kDa de peso molecular se degradó a las 4 horas, tanto en la biomasa libre como en la inmovilizada.

A la seis horas se observó la permanencia de las proteínas β -Lg y α -La de 14 y 18 kDa de peso molecular. Respectivamente tanto en la biomasa libre como en la biomasa encapsulada. El hidrolizado con microorganismo libre a las 24 horas no mostró cambios con respecto al de las 6 horas.

En general, el comportamiento de electroforesis con microorganismo libre y Resultados similares de degradación de las proteínas a las 24 horas fueron obtenidos por Sponton *et al.*, (2014) β -Lg con α -quimiotripsina inmovilizada en agarosa.

3.4.3 Ciclos de reúso de encapsulados en la hidrólisis de los concentrados proteicos

Los resultados correspondientes al grado de hidrólisis expresado en porcentaje, durante una incubación de *B. subtilis* encapsulado (AQPEG) a las 2, 4, 6 y 8 horas se expone en la figura 3.9, en donde se muestran cinco ciclos que corresponden a un período de incubación del microorganismo de 8h.

Los resultados muestran que el GH es de 7.3 % en las dos primeras horas, de 20.5 % a las 4 horas, 39.8 % a las 6 horas y de 44.8 % en 8 horas. Los ciclos de hidrólisis subsecuentes muestran una degradación parecida al del primer ciclo, por lo cual se puede observar que la actuación del microorganismo ha sido similar en los 5 ciclos de prueba. Sin embargo cabe destacar que la actuación del microorganismo en el periodo de incubación de seis horas ha sido de forma constante ya que el grado de

hidrólisis ha oscilado en un promedio de 34 %, muy similar en los cinco ciclos, esto pudo ser debido a que el microorganismo no tuvo interferencia celular con el material de inmovilización.

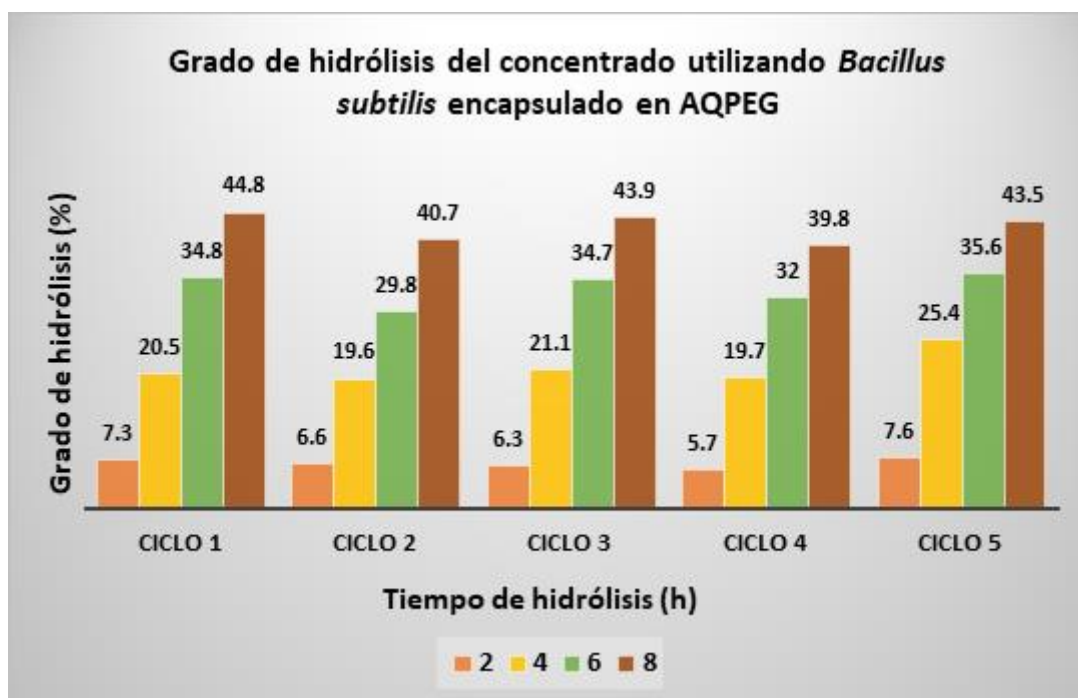


Figura 3.9 Grado de hidrólisis con *Bacillus subtilis* encapsulado en AQPEG

Algunos autores que trabajaron con microorganismo o enzimas inmovilizadas mostraron que éstas mantienen su actividad catalítica hasta en un 80 %. Romo *et al.*, (2014) mostró en su estudio que después de 19 reutilizaciones, la celulasa inmovilizada en quitosano ostenta 64 % de su actividad inicial y la xilanasa después de 6 ciclos muestra una actividad de 81 %, en condiciones óptimas para estas enzimas. Silva *et al.*, (2015), inmovilizaron la tripsina en esferas de PET/PLA; las esferas mantuvieron una actividad mayor de 57 %, después de 30 días de almacenamiento a 4 °C. Fueron utilizadas 8 veces sin perder su actividad.

La matriz de encapsulación que fue utilizada en cinco ciclos de hidrólisis con un tiempo de incubación de 8 horas se ilustran en la figura 3.10, en la cual se observó

que no presentó fractura o cizallamiento; su apariencia es parecida a la inicial, lisas y poco o ningún hinchamiento.

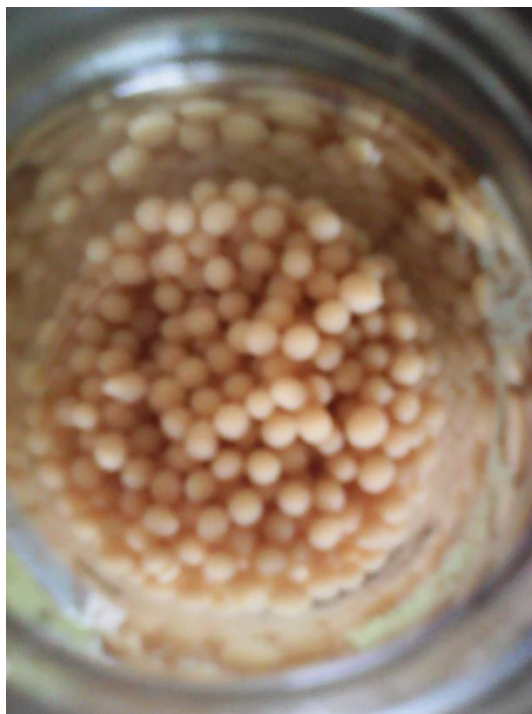


Figura 3.10 Matriz de encapsulación del *B. subtilis* al término 5 ciclos de hidrólisis en AQPEG

Esto puede ser explicado debido al entrecruzamiento que se presenta en los materiales utilizados, según Berger *et al.* (2004) y Segale *et al.* (2016). Los hidrogeles de quitosano entrecruzados covalentemente presentan una estructura porosa, una mayor resistencia mecánica y menor hinchamiento. Esta modificación química del quitosano puede ser llevada a cabo con polímeros biocompatibles solubles como el alginato y polietilenglicol que permiten la unión mediante enlaces iónicos y covalentes Zia *et al.*, (2017). Otras interacciones que se presentan en la formación de estos polímeros son puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals (Cárcamo, 2005).

3.5 Obtención de fracciones peptídicas activas de hidrolizados por NF

En la figura 3.11 se presentan las muestras obtenidas del fraccionamiento del hidrolizado mediante una membrana de NF; el permeado del hidrolizado (HP) un líquido transparente, incoloro y con un olor agradable y el concentrado del hidrolizado (HC) un líquido semitransparente de color amarillo claro de olor agradable.



Figura 3.11 Concentrado y permeado, fracciones del hidrolizado

3.5.1 Peso molecular de las fracciones peptídicas mediante SDS-PAGE

En esta etapa se reportan los resultados del análisis de electroforesis de las fracciones obtenidas en el proceso de NF, HC de pesos moleculares $> 3\text{kDa}$ y HP de peso molecular $< 3\text{kDa}$, mediante el diagrama dado en la figura 3.12.

En el esquema se observa que el hidrolizado (H) contiene aún proteínas $\beta\text{-Lg}$ y $\alpha\text{-La}$ y fracciones peptídicas menores a 11kDa .

En el caso de las fracciones peptídicas HP Y HC se observa únicamente posibles fracciones entre 3 y 5kDa .

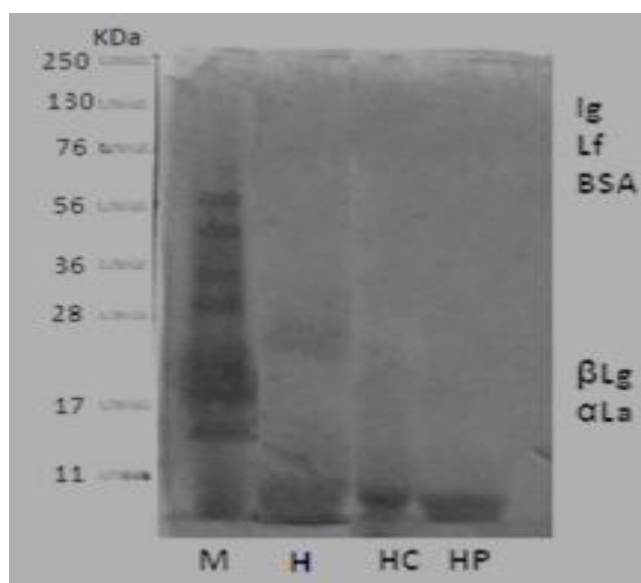


Figura 3.12 SDS –PAGE del hidrolizado (H) y sus fracciones, concentrado (HC) y permeado (HP)

3.5.2 Perfil de aminoácidos de las fracciones peptídicas mediante HPLC

En la tabla 3.7 se presenta el perfil de aminoácidos (aa) de las fracciones peptídicas del hidrolizado HC y HP mediante HPLC, la cantidad de aminoácidos está dada en mg aa/100 mL de muestra. En la tabla también se muestra en las primeras columnas el nombre del aminoácido, su simbología y peso molecular expresado en Daltones (Da).

En esta tabla se puede observar que la cantidad de aminoácidos presentes en el HP (5.16 mg/100 mL de muestra) y HC (4.48 mg/100 mL de muestra) fue similar. Sin embargo, las cantidades de los aminoácidos de manera individual es diferente. Por ejemplo, la arginina es de 0.05 en el HP y de 0.19 en HC, la treonina de 0.25 en el permeado y no aparece en el HC y así sucesivamente. La serina, metionina e histidina no están presentes en ninguna de las fracciones.

Las fracciones HP probablemente provenientes de β -Lg y α -La son péptidos pequeños menores a 3 kDa y las fracciones de HC, probablemente provenientes de

las mismas proteínas, son péptidos pequeños mayores a 3kDa; ambas fracciones con diferentes combinaciones de aminoácidos.

Tabla 3.7 Perfil de aminoácidos HP y HC

Aminoácido	Pesos Moleculares (Da)	Símbolo	(HP)mg aa/100mL de muestra	(HC) mg aa/100mL de muestra
Treonina	119.1	Thr o T	0.25	ND
Ácido aspártico	133.1	Asp o D	0.06	0.03
Serina	105	Ser o S	ND	ND
Ácido glutámico	147.1	Glu o E	3.68	3.01
Glicina	75	Gly o G	0.09	0.06
Alanina	89	Ala o A	0.21	0.10
Cisteína	121.1	Cys o C	0.01	ND
Valina	119.1	Val o V	0.06	0.18
Metionina	149.2	Met o M	ND	ND
Isoleucina	131.2	Ile o I	ND	ND
Leucina	131.2	Leu o L	0.07	0.28
Tirosina	181.2	Tyr o Y	0.05	0.18
Fenilalanina	165.2	Phe o F	0.63	0.46
Lisina	146.2	Lys o K	ND	ND
Histidina	155.1	His o H	ND	ND
Arginina	174.2	Arg o R	0.05	0.19
Total	-----	-----	5.16	4.48

ND no detectado

Los aminoácidos como la valina, la leucina, la fenilalanina, la tirosina y otros forman parte de las fracciones peptídicas con actividad antihipertensiva según, Hernández *et al.*, (2002) las fracciones peptídicas obtenidos de β -Lg caprina están formados por cadenas de aminoácidos LQKW, LLF, LVRT, con actividad antihipertensiva considerable. Otte *et al.*, (2007) reportó péptidos con actividad antihipertensiva o inhibitorios de la ACE con fracción peptídica LYQQP, a partir de hidrolizados de caseína con termolisina.

Pihlanto-Leppälä *et al.*, (2001) obtuvieron péptidos inhibitorios de la ACE con fracción peptídica LDAQSAPLR, VFK, VGINXW, LAHK con β -Lg, α -La a partir de hidrolizados de tripsina.

3.6 Actividad inhibitoria de la ECA de las fracciones peptídicas

Los resultados de actividad antihipertensiva del hidrolizado de proteínas de suero (H) y sus fracciones HC y HP, obtenidos con encapsulados de *B. subtilis*, se presentan en la tabla 3.8, expresados en porcentaje de inhibición de la ECA.

Tabla 3.8 Inhibición de la ECA del hidrolizado y sus fracciones expresado en porcentaje

Fracción	H	HP	HC
Inhibición de la ECA (%)	40.27	82.3	66.37

Los valores obtenidos indicaron que HC y HP presentaron una buena inhibición de la ECA. Las fracciones que presentaron mayor actividad fueron las HP, seguidas de HC y H. Este resultado se esperaba debido a que en HC se encuentran los péptidos de menor tamaño (<3kDa), los cuales han sido identificados como inhibitorios de la ECA en varias investigaciones. Ronquillo *et al.*, (2012) obtuvieron fracciones por debajo de 2.4 kDa con la mayor actividad antihipertensiva; Pihlanto Leppälä (2001) reportó que la fracción de mayor actividad de péptidos se presentó en aquellas con 2 a 3 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 0.3 kDa.

Por otro lado, el resultado de inhibición que se obtuvo en las fracciones fueron similares a los reportados por otros autores en hidrolizados de diversas proteínas y bajo condiciones diferentes, esto indica que tanto el microorganismo *B. subtilis* y la estrategia de su encapsulamiento no limitaron su acción proteolítica, y que el tiempo

de hidrólisis de 6 h fue también suficiente para obtener hidrolizados antihipertensivos.

Algunas investigaciones cuyo reporte muestra similar actividad antihipertensiva, son los siguientes. Hernández *et al.*, (2002) reportó 82.5 % y 77 % de inhibición en hidrolizados de β -Lg ovina mediante termolisina, incubada durante 2 h y 8 h, respectivamente. A su vez, Ronquillo *et al.*, (2012) obtuvieron la mayor actividad de 51 % de inhibición en fracciones de hidrolizados de proteínas de suero de leche con *Lactobacillus casei shirota* a las 15 h de fermentación; mientras que en hidrolizados con *Streptococcus thermophilus* sólo se obtuvo el 22 % a las 42 h, con el mismo sustrato. Mullally *et al.*, (1997) obtuvieron 73.1 %, 77.7 % y 78.2 % en hidrolizados de WPC, de la α -La, y de β -Lg con la enzima Corolase a las 4 h de incubación.

Además del tamaño de los péptidos, los resultados obtenidos sobre la actividad antihipertensiva se atribuyen a la presencia de aminoácidos Val, Ala, Fe, Leu, Arg y Tyr en HP y HC, encontrados en mayor cantidad algunos de ellos en HP.

La actividad antihipertensiva se asocia a la inhibición de la ECA, la que, a su vez, se relaciona con la interacción del extremo C-terminal de la secuencia del sustrato (en este caso proteínas lácteas) con el centro activo de la ECA, bloqueando dicho centro para prevenir que angiotensina-I se una a éste, lo cual provoca la acción antihipertensiva. El C-extremo terminal, que bloquea el centro activo de la ECA, se caracteriza porque contienen residuos de aminoácidos alifáticos (Val, Ile y Ala), básicos (Arg) y aromáticos (Tyr, Fen), siendo sustratos específicos de la ECA, mientras que los residuos aromáticos (Trp, Tir, Fen y Pro) y alifáticos (Ile, Ala, Leu y Met) favorecen la unión a la enzima cuando están situados en la última posición del extremo C-terminal del péptido (Hayes *et al.*, 2007). Otros aminoácidos con la misma acción y de carga positiva son la Arg, Lys o Leu interaccionan también, aunque en menor medida, con el centro activo de la ECA, identificándose como sustratos competitivos de esta enzima.

De acuerdo a los autores Hernández (2002), Quirós (2007) y Ronquillo (2012) la actividad inhibidora de los dipéptidos con Tir es mayor que la de aquellos con Phe, aunque inferior a la de los que tienen Pro en el extremo C-terminal. Lo anterior fue demostrado cuando se administraron de forma oral, dipéptidos con Tir y con Phe en modelo de ratas SHR, y se encontró que la presión arterial fue reducida lentamente.

En cambio, los dipéptidos con Phe disminuyeron la presión arterial más rápida, pero de más corta duración.

En la tabla 3.9 se muestran algunos trabajos en los que se reporta la secuencia de aminoácidos hidrofóbicos (Trp o W, Pro o P, Phe o F, Ala o A) o aminoácidos con carga positiva (Lys o K y Arg o R) con actividad antihipertensiva, así como la enzima utilizada.

Tabla 3.9 Secuencia de aminoácidos Inhibidores de la ECA

Proteína	Enzimas Microorganismos	Secuencia de péptidos	Actividad	Referencias
β -Lg, α -La	Tripsina	LDAQSAPLR, VFK, VGINXW, LAHK	Antihipertensiva	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> 2001
N α -Caseína,	Pepsina, tripsina, proteinasa-K, termolisina	LYQQP	Antihipertensiva	Otte <i>et al.</i> 2007
Caprine β -Lg	Termolisina	LQKW, LLF, LVRT	Antihipertensiva	Hernández <i>et al.</i> 2007
β -Lg BSA	Proteinasa K	IPA, FP	Antihipertensiva	Abubakar <i>et al.</i> 1998
α -La	Pepsina y tripsina	YGLF	Antihipertensiva	Nurminen <i>et al.</i> 2000
Lactoferrina de bobino	Pepsina, tripsina y quimotripsina	LRPVAA	Antihipertensiva	Lee <i>et al.</i> 2006
K-caseína	Quimosina	RYPSYG NQRF	Antihipertensiva	Jiang <i>et al.</i> 2010

3.7 Encapsulación de fracciones peptídicas

Los sistemas de encapsulamiento mostrados en la figura 3.13 Alginato (A) alginato-colágeno (AC), alginato-goma arábica (AG) y alginato-gelatina (AGE) exhibieron una consistencia blanda y una textura suave de color blanco o transparente de tamaño esférico regular de aproximadamente 1-2 mm de diámetro y de apariencia semejante.

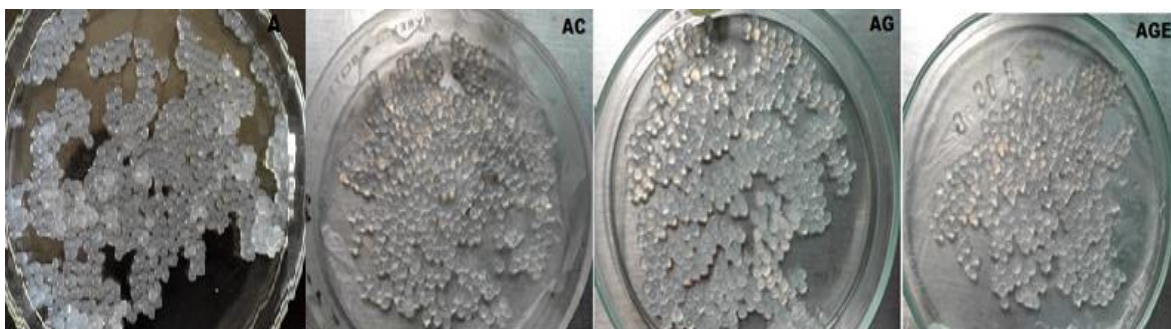


Figura 3.13 Esferas obtenidas para la encapsulación de fracciones peptídicas activas utilizando diferentes matrices de encapsulación. De izquierda a derecha, A, AC, AG y AGE.

3.7.1 Obtención del tamaño de poro de los sistemas de encapsulación de las fracciones peptídicas

Los resultados de volumen de poro y diámetro del poro se especifican en la tabla 3.10.

En este caso se observa que todos los sistemas de encapsulamiento de los péptidos antihipertensivos estudiados, fueron porosos; lo cual es importante para considerarlos como sistemas de liberación. En particular, los sistemas de materiales compósitos AC, AG y AGE presentaron un menor diámetro de poro en comparación con el sistema A; evidenciando que la incorporación de los materiales C, G y GE en A, fue adecuada, ya que disminuyeron el tamaño del poro, cumpliendo su función de materiales de relleno. En este caso se destaca que el compósito AGE dio como resultado un menor tamaño, mientras que los compósitos AC y AG fueron semejantes.

Lo anterior se explica por la formación de complejos polielectrolitos, en el caso de la unión de A con C y GE (proteínas), y en la unión de A con G mediante el ácido gulurónico.

Tabla 3.10 Área superficial y tamaño del diámetro de poro de los encapsulados, A, AC, AG y AGE

Material del sistema de encapsulación		Volumen de la esfera (cm ³ /g)	Volumen del poro (cm ³ /g)	Diámetro del poro (μm)
1	A	2.765	0.1139	0.0092
2	AC	0.3228	0.0019	0.0055
3	AG	0.2486	0.0016	0.0061
4	AGE	0.4489	0.0018	0.0038

3.8 Capacidad de liberación de péptidos por los sistemas encapsulantes

El resultado de la liberación de los péptidos encapsulados en AC, AG y AGE en condiciones gastrointestinales se muestra en la tabla 3.11 estos resultados expresados en porcentaje se midieron a las dos horas en solución de pH 2 (condiciones de fluidos gástricos) y a las 4 h a pH 7.5 (condiciones de fluidos intestinales), tomando como referencia el contenido inicial de péptidos en los sistemas de encapsulación.

Además, en la figura 3.13 se presentan las cápsulas de cada sistema, después de 4 horas de ser sometidas a la simulación gastrointestinal.

Tabla 3.11 Porcentaje de péptidos liberados por los sistemas de encapsulamiento A, AC, AG y AGE bajo condiciones gastrointestinales durante 2 y 4 h.

Tiempo (h)	Fracciones peptídicas encapsuladas			
	A	AC	AG	AGE
2	15.3	25.4	29.1	20.1
4	14.8	73.7	77.3	70.4

Los datos de la tabla 3.11, muestran un porcentaje de liberación de péptidos para el sistema A, de aproximadamente 30 % en 4 h. Mientras que para los sistemas AC,

AG y AGE, el porcentaje de liberación fue entre 20-29 % a las 2 h, y entre 70-77 % a las 4 h.

En la explicación a los resultados anteriores, se destaca el pobre porcentaje de liberación obtenido por el sistema A (utilizado como sistema control), probablemente atribuido a dos factores. i) Debido a las posibles interacciones de A y los péptidos; desarrollándose sistemas de encapsulamiento más compactos que no permitieron la liberación. ii) Debido a la fuga de péptidos a través de los poros, y su posterior y rápida degradación por la enzima gástrica y el pH en los fluidos.

La primera suposición fue confirmada en la figura 3.14, donde se muestra que las cápsulas del sistema A, no presentaron degradación, desgaste, rompimiento o erosión en 4 h de digestión, por el contrario se observan cápsulas firmes; indicando presumiblemente interacción entre los péptidos y el alginato.

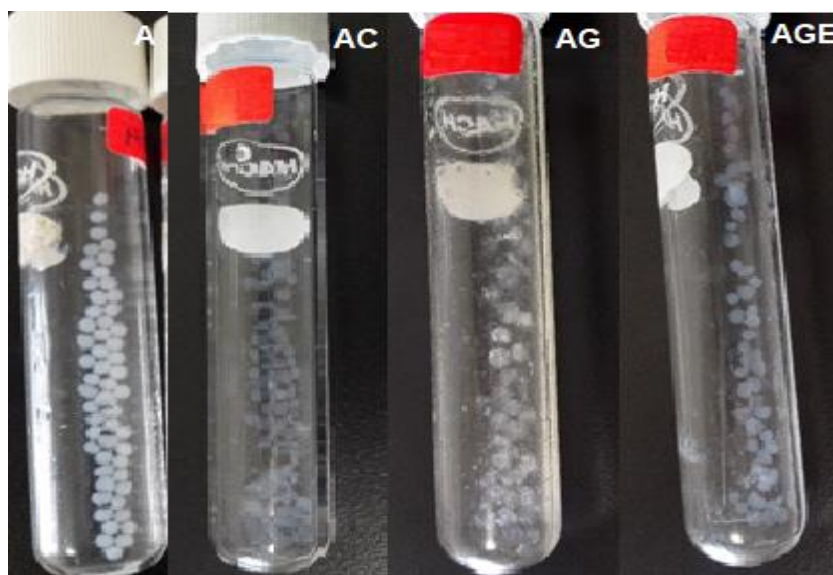


Figura 3.14 Encapsulados de fracciones peptidicas con A, AC, AG Y AGE al termino de la simulacion gastro intestinal

En el caso de los sistemas compósitos AC, AG y AGE, se considera que la liberación fue dosificada y en similar proporción, y dentro de este rango, el mayor porcentaje de liberación fue encontrado en AG con 77.3 %.

Por tanto, los compósitos cumplieron su función de sistemas de liberación controlada. Este resultado se atribuye a la adecuada porosidad de los sistemas, pobre interacción de los péptidos con los materiales de los sistemas, y a la resistencia mecánica de éstos, contra la acción de los fluidos gástricos. Resultados semejantes fueron reportados por Erdinc *et al.*, (2011) los cuales obtuvieron una liberación de 35 % de seroalbumina bovina microencapsulada en matriz de quitosano glicol alginato, en 2 h de contacto con los fluidos gástricos. Y una mayor liberación en 4 h en fluidos intestinales.

Por otro lado, Kavianinia *et al.*, (2014) reportaron 37 % a 40 %, también de liberación de seroalbumina bovina encapsulada en quitosano después de 2 h y el resto, después de 8 h en condiciones de simulación gástrica. Mientras que en Rao *et al.*, (2016) se presenta una liberación de hidrolizados de caseína encapsulados en goma arábica con maltodextrina de 84 % después de 2 h y de 20 % de liberación después de 4 h en las mismas condiciones gastrointestinales; este resultado se asoció a la rápida degradación de la goma y maltodextrina por las enzimas gástricas.

3.8.1 Actividad antihipertensiva de los péptidos liberados

Los péptidos liberados de los encapsulados mostraron los valores de porcentaje de la actividad inhibitoria ECA que se presentan en la tabla 3.12. Los valores corresponden a los péptidos liberados después de 4 h de digestión en los fluidos gástricos y tomando como referencia la actividad inhibitoria ECA del 82.3 %.

Tabla 3.12 Porcentaje de la actividad inhibitoria de la ECA de las fracciones peptídicas encapsuladas en A, AC, AG y AGE bajo condiciones gastrointestinales durante 4 h.

Fracciones peptídicas libres (%)	Fracciones peptídicas encapsuladas (%)			
5.1	A	AC	AG	AGE
	13.3	68.7	80.35	49.56

La actividad inhibitoria de la ECA de los péptidos libres (sin encapsular y utilizados como control) en condiciones de simulación gástrica, mostraron un menor porcentaje de actividad como era de esperarse, ya que las enzimas gástricas los degradan rápidamente, lo cual pudo haber sucedido desde las primeras dos horas. Algo parecido sucedió con la actividad de los péptidos liberados por el sistema de encapsulación A, ya que su actividad fue de 13.3%, correspondiente probablemente a los escasos péptidos que fueron liberados en 4 h de digestión.

Por otro lado, los péptidos liberados por los sistemas compósitos mostraron una actividad mayor. Así, estos encapsulados retuvieron y mantuvieron péptidos con actividad inhibitoria ECA del 60 % en AGE, 83 % en AC y 97 % en AG; resaltando este último dato, como la actividad mayor alcanzada por este encapsulado.

Por tanto, el sistema AG dio como resultado, un sistema adecuado de liberación de péptidos de hidrolizados de proteínas de suero lácteo < 3 kDa y de retención de actividad inhibitoria ECA (antihipertensiva), lo cual se asocia a la porosidad del sistema, escasa interacción péptidos-material y su degradación gradual en condiciones gastrointestinales.

Comparando los datos encontrados en este trabajo, con los obtenidos por otros autores, en relación con el encapsulamiento y liberación de moléculas activas provenientes del suero lácteo en simulación gástrica, Bokkhim *et al.*, (2016) reportaron una liberación de 41-58 % de lactoferrina en fluidos gástricos y de 76-89 % en fluidos intestinales. Mientras que Rao *et al.*, (2016) obtuvieron 93 % de retención de actividad antioxidante en péptidos de hidrolizados de caseína

encapsulados en G-M (goma arábica y maltodextrina; en este caso, los autores indicaron los beneficios del material para la retención de actividad antioxidante, confirmando que la goma arábica interviene en la retención de la actividad de los péptidos de leche.

CONCLUSIONES

Como conclusiones de la investigación sobre la obtención de péptidos antihipertensivos de suero lácteo y su encapsulación, se destacan las siguientes.

El proceso enzimático de hidrólisis de proteínas de suero lácteo, mediante biomasa encapsulada de *B. subtilis* fue adecuado para la obtención de péptidos activos. En este caso, el comportamiento enzimático del microorganismo encapsulado en alginato-quitosano-polyetilenglicol fue gradual, pasando de 20 % de hidrólisis en 2h, hasta obtener una máxima de alrededor del 50 % en 6 h, obtenido productos hidrolizados del 50 % con fracciones peptídicas.

En comparación con el microorganismo libre, la hidrólisis obtenido fue del 40 % en 2 h; alcanzando un máximo de 60 %, también en 6 h. Lo cual significa que la encapsulación de biomasa en este material, no inhibió la acción enzimática del *B. subtilis*. Además, los mayores beneficios obtenidos de la encapsulación de este microorganismo, se encontraron en la fácil separación de los encapsulados de los productos hidrolizados, así como el reúso de dichos encapsulados de hasta cinco ciclos de hidrólisis; sugiriendo el uso de biomasa encapsulada en la hidrólisis de proteínas, debido al costo-beneficio que puede resultar, en comparación con el uso de enzimas purificadas, que son de mayor costo, y además pueden originar sabores, texturas y pérdidas de actividad del producto hidrolizado.

Por otro lado, de acuerdo al análisis de electroforesis, las fracciones peptídicas mostraron degradación de las proteínas de mayor peso molecular como la Ig, Lf y la BSA, por lo que probablemente, dichas fracciones contenían péptidos activos en su mayoría provenientes de las proteínas β -Lg y α -La.

A partir de los hidrolizados obtenidos, se encontró que las fracciones peptídicas de peso molecular menores a 3 kDa, mostraron mayor actividad inhibitoria de la ECA del 82.3 % (antihipertensiva); identificando en estas fracciones, un mayor contenido de aminoácidos como la valina, leucina, fenilalanina, tirosina, los cuales son reconocidos como aminoácidos promotores de inhibición de la ECA.

Con respecto a la encapsulación de las fracciones peptídicas activas, el sistema alginato-goma arábica, permitió una liberación gradual de dichos péptidos en fluidos gástricos, obteniéndose una mayor liberación en 4 h, debido al rompimiento del encapsulado, dada su degradación por los fluidos intestinales.

En análisis de la actividad inhibitoria ECA de los péptidos activos liberados en 4 h, arrojó 77 % de esta actividad, por tanto, el sistema de encapsulamiento mencionado, retuvo dicha actividad, durante el tiempo que permanecieron intactas las cápsulas. Además, dada la liberación gradual de péptidos, se estableció, que este sistema de encapsulamiento puede ser utilizado como medio de liberación de péptidos activos en condiciones gastrointestinales. Sin embargo con respecto al sistema encapsulante, son necesarios más estudios sobre su comportamiento cinético de degradación en fluidos gástricos, interacción con los péptidos activos y viabilidad para su suministro al cumplir con las condiciones de biocompatibilidad y biodisponibilidad de moléculas activas. Por lo cual es recomendable continuar con este tipo de investigaciones.

REFERENCIAS

Abaigar, A., (2009). El lactosuero en la alimentación del ganado porcino. ITG Ganadero: p. 13-17.

Abdel-Hamid, M., Otte, J., De Gobba, C., Osman, A., & Hamad, E. (2017). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. *International Dairy Journal*, 66, 91-98.

Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., & Itoh, T. (1998). Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *Journal of Dairy Science*, 81(12), 3131-3138.

Acevedo C., (2010). Gelificación fría de las Proteínas del Lactosuero. Universidad de Cartagena, Cartagena-Colombia, ReCiFRIA, p. 8

Alais C.A., (1985). Ciencia de la Leche. Principio de Técnica Lechera. Editorial Reverte S. A. Cuarta Edición. p. 195.

Alfaro M., (2012). Desarrollo de metodologías de encapsulación utilizando aislado proteico de suero lácteo modificado con azúcares para la protección de ingredientes activos en alimentos. Tesis Doctoral. Univercidad Central de Venezuela. Facultad de ciencias.

Alting, L., Hauschild, M., & Wenzel, H. (1997). Environmental assessment in product development. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 355(1728), 1373-1388.

Alvarado-Carrasco, C., & Guerra, M. (2012). Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *Anales Venezolanos de Nutrición*; Vol. 23 No. 1, p 42-49.

Alvarado, Y., Muro, C., Illescas, J., Díaz, C., & Riera, F. (2016). Functionalized Polymers for Enhance Oral Bioavailability of Sensitive Molecules. *Polymers*, 8, 214.

Badui, D.S, (2006). Química de los Alimentos. Cuarta Edición. Pearson Educación, México. Editores S.A. de C.V. ISBN: 970-26-0670-5. p 151.

Baldasso, C., Barros, T. C., & Tessaro, I. C. (2011). Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination*, 278(1), 381-386.

Battaner D., (1993). Biomoléculas. Primera edición. Ediciones Universidad de Salamanca. p 200.

Baysal, K., Aroguz, A. Z., Adiguzel, Z., & Baysal, B. M. (2013). Chitosan/alginate crosslinked hydrogels: Preparation, characterization and application for cell growth purposes. *International journal of biological macromolecules*, 59, 342-348.

Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 42(2), 227-236.

Bensussan N, (2002). New insight into direct role of lactic acid bacteria in lactose digestion. *Yoghurt and fermented milks letter* No. 8. p 1.

Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., & Gurny, R. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 19-34.

Bokkhim, H., Bansal, N., Grøndahl, L., & Bhandari, B. (2016). In-vitro digestion of different forms of bovine lactoferrin encapsulated in alginate micro-gel particles. *Food Hydrocolloids*, 52, 231-242.

Bosio V., (2012). Desarrollo de matrices biopoliméricas para liberación de moléculas de interés biológico. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de ciencias exactas. Departamento de química.

Brines Solanes, J., Crespo Hernández, M., Cruz Hernández, M., Delgado Rubio, A., Hernández Rodríguez, M., & RuzaTarrio, F. J. (1997). Manual del residente de Pediatría y sus áreas específicas. *Las Rozas, Madrid, ediciones Norma*. Vol. 2. p 1680.

Cárcamo Gatica, C. (2005). Preparación de films de complejo polielectrolito quitosano-alginato y comparación de sus propiedades mecánicas y biológicas con films de quitosano. <http://www.repositorio.uchile.cl/handle/2250/105463>.

Cardona Trujillo, V., & Padilla Quintero, B. C. (2013). *Preparación y caracterización fisicoquímica y estructural de un gel conductor a base de quitosano [recurso electrónico]* (Doctoral dissertation).

Castro, S., Peyronel, D. V., & Cantera, A. M. B. (1996). Proteolysis of whey proteins by a *Bacillus subtilis* enzyme preparation. *International dairy journal*, 6(3), 285-294.

Chandrasekar, V., Coupland, J. N., & Anantheswaran, R. C. (2017). Characterization of nisin containing chitosan-alginate microparticles. *Food Hydrocolloids*, 69, 301-307.

Chowdhury, J. A., Jahan, S. T., Morshed, M. M., Mallick, J., Nath, A. K., Uddin, M. Z., & Kawsar, M. H. (2011). Development and evaluation of diclofenac sodium loaded alginate cross-linking beads. *Bangladesh Pharmaceutical Journal*, 14(1), 41-48.

Clare D.A., Swaisgood H. E., (2000). Bioactive Peptides; A Prospectus. Departments of Food Science and Biochemistry. Journal of dairy science. Volume 83 (6) June 2000, pages 1187-1195.

Cuartas Uribe, B. E. (2005). Estudio del proceso de nanofiltración para la desmineralización del lactosuero dulce. Tesis doctoral. Universitat Politècnica de Valencia.

Cushman, D. W., & Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical pharmacology*, 20(7), 1637-1648.

Cruz T. J., Páez R., Belén P. B., Schmidt E., (2008). Características Generales Sobre el Uso del Suero de Queso en la Provincia de Santa Fe. Instituto Nacional de Tecnología Industrial y Agropecuaria. 9-10.

Das, R. K., Kasoju, N., & Bora, U. (2010). Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(1), 153-160.

Del Mar Contreras, M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M., & Recio, I. (2009). Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, 19(10), 566-573.

Erdinc, B., & Neufeld, R. J. (2011). Protein micro and nanoencapsulation within glycol-chitosan/Ca²⁺/alginate matrix by spray drying. *Drug development and industrial pharmacy*, 37(6), 619-627.

Erdmann, K., Cheung, B. W., & Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of nutritional biochemistry*, 19(10), 643-654.

Figuerola-Hernández, C., Cruz-Guerrero, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M., & Jiménez-Guzmán, J. (2012). Producción de péptidos fijadores de calcio y hierro por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(2), 259-267.

FitzGerald, R. J., Murray, B. A., & Walsh, D. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *The Journal of Nutrition*, 134(4), 980S-988S.

Floris, R., Recio, I., Berkhout, B., & Visser S. (2003). Antibacterial and antiviral effects of milk proteins and derivatives thereof. *Curr Pharm Des*, 9(16), 1257-75.

Gandini, A. (2010). Furans as offspring of sugars and polysaccharides and progenitors of a family of remarkable polymers: a review of recent progress. *Polymer Chemistry*, 1(3), 245-251.

García, L. A., Betancur, J. A. N., Ramírez, A. M. F., & Arboleda, L. M. H. (2015). Estudio de la síntesis de biopolímeros de origen microbiano. *Revista QUID*, (25).

Garrido P. A., Teijon R. J. Ma., Blaco G.D., Villaverde G. C., Mendoza O.C., Ramírez R. J., (2006). Fundamentos de Bioquímica Estructural. 2da edición editorial Tebar. p 165.

Gil H. A., (2005). Tratado de Nutrición. Editorial Médica Panamericana. Tomo 2. 2da Edición p 6, 371, 54.

Gil, H. A. *Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*. edit. Médica Panamericana, (2010), 820 p. ISBN 978-84-9835-347-1.

Gill, H.S., Doull, F., Rutherford, K.J. & Cross, M.L, (2000). Immunoregulatory peptides in bovine milk. *British Journal of Nutrition*, 84, 111-117.

Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F., & Addeo, F. (2000). Production of Angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3898-3904.

Gómez-Mascaraque, L. G., Miralles, B., Recio, I., & López-Rubio, A. (2016). Microencapsulation of a whey protein hydrolysate within micro-hydrogels: Impact on gastrointestinal stability and potential for functional yoghurt development. *Journal of Functional Foods*, 26, 290-300.

González-Olivares, L. G., Jiménez-Guzmán, J., Cruz-Guerrero, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., & García-Garibay, M. (2011). Liberación de péptidos bioactivos por bacterias lácticas en leches fermentadas comerciales. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(2), 179-188.

Gösta B. M., López G. A., (2003). Manual de las Industrias Lácteas. Editores: Mundi Prensa LibrosS.A. España ISBN: 84-89922-81-084-8476-094-4. Capítulo 15 p 335.

Guadix, A., Guadix, E. M., Dueñas, M. P., González-Tello, P., & Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 79-89.

Guarner F. (2002). Probiotics in inflammatory bowel diseases. Yoghurt and fermented milks: benefits of live cultures. International symposium. Paris, September 25 2002.

Guo, Y., Pan, D., & Tanokura, M. (2009). Optimisation of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, 114(1), 328-333.

Hartmann, R., & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current opinion in biotechnology*, 18(2), 163-169.

Harriman, A., Morais, Marialice P.C., Silvestre, Viviane D.M., Silva, Mauro, R., Silva, Ana Cristina Simoes e Silva & Josianne N. Silveira, (2013). Correlation between the Degree of Hydrolysis and the Peptide Profile of Whey Protein Concentrate Hydrolysates: Effect of the Enzyme Type and Reaction Time. *American Journal of Food Technology*, 8: 1-16.

Hayes, M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2007). Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part I: overview. *Biotechnology Journal*, 2(4), 426-434.

Hernández-Aguilar, M., Talayero, J. M., Pemán, J., Palomares, M. S., Soto, B. B., & Muncharaz, M. J. (2009). Uso de antibióticos y lactancia materna. *Revista Española de Quimioterapia*, 22(4).

Hernández B. (2002). Caracterización y bioactividad de péptidos obtenidos a partir de proteínas lácteas mediante hidrólisis enzimática y proceso fermentativo. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de farmacia. ISBN: 84-669-2033-1.

Hernández-Ledesma, B., Recio, I., Ramos, M., & Amigo, L. (2002). Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *International Dairy Journal*, 12(10), 805-812.

Hernández-Ledesma, B., Quirós, A., Amigo, L., & Recio, I. (2007). Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal*, 17(1), 42-49.

Hernández-Rojas, M., & Vélez-Ruiz, J. F. (2014). Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(2), 13-22.

Hong, E.; Bravo, G.; Villalobos-Molina, R. (2003). Hipertensión Arterial. Avance y Perspectiva, 22, 243-249.

Ibrahim, H. R., Ahmed, A. S., & Miyata, T. (2017). Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. *Journal of advanced research*, 8(1), 63-71.

Jiang, Z., Tian, B., Brodkorb, A., & Huo, G. (2010). Production, analysis and in vivo evaluation of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from bovine casein. *Food chemistry*, 123(3), 779-786.

Kavianinia, I., Plieger, P. G., Kandile, N. G., & Harding, D. R. (2014). In vitro evaluation of spray-dried chitosan microspheres crosslinked with pyromellitic dianhydride for oral colon-specific delivery of protein drugs. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(15).

Koolman J., Klaushenrich., (2004). Bioquímica Texto y Atlas. Editorial Médica Panamericana. 3era edición en español. p 176.

Laemmli UK., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.

Lee, S. J., Kim, S. S., & Lee, Y. M. (2000). Interpenetrating polymer network hydrogels based on poly (ethylene glycol) macromer and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 41(2), 197-205.

Lee, N. Y., Cheng, J. T., Enomoto, T., & Nakamura, I. (2006). Essential of proline and valine residues in the peptide derived from lactoferrin for angiotensin converting enzyme inhibition. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 53(3), 515-518.

Lewis, M.J. (2008). Separaciones en el procesamiento de alimentos. Procesos de membrana. En J.G. Brennan, Manual del procesamiento de alimentos (480-497). Zaragoza:Acibia S.A.

Ma, J. J., Mao, X. Y., Wang, Q., Yang, S., Zhang, D., Chen, S. W., & Li, Y. H. (2014). Effect of spray drying and freeze drying on the immunomodulatory activity, bitter taste and hygroscopicity of hydrolysate derived from whey protein concentrate. *LWT-Food Science and Technology*, 56(2), 296-302.

Macea, R. B., De Hoyos, C. F., Montes, Y. G., Fuentes, E. M., & Ruiz, J. I. R. (2015). Synthesis and film properties of chitosan and whey. *Polímeros*, 25(1), 58-69.

Mao, X. Y., Ni, J. R., Sun, W. L., Hao, P. P., & Fan, L. (2007). Value-added utilization of yak milk casein for the production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Chemistry*, 103(4), 1282-1287.

Mayolo-Deloisa, K. P., & Rito-Palomares, M. (2010). Proteínas PEGiladas: producción, purificación y aplicaciones. *Revista mexicana de ingeniería química*, 9(1), 17-27.

Meisel, H. (2005). Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Current medicinal chemistry*, 12(16), 1905-1919.

Millet, J. (1970). Characterization of proteinases excreted by *Bacillus subtilis* Marburg strain during sporulation. *Journal of Applied Bacteriology*, 33(1), 207-219.

Miranda, O., Ponce, I., Fonseca, P., Cutiño, M., Díaz, R., & Cedeño, C. (2009). Características físico-químicas de sueros de queso dulce y ácido producidos en el combinado de quesos de Bayamo. *La Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 19(1), 21-25.

Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., & Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47(4), 171-182.

Mohan, A., McClements, D. J., & Udenigwe, C. C. (2016). Encapsulation of bioactive whey peptides in soy lecithin-derived nanoliposomes: influence of peptide molecular weight. *Food chemistry*, 213, 143-148.

Monteiro, O. A., & Airoldi, C. (1999). Some thermodynamic data on copper–chitin and copper–chitosan biopolymer interactions. *Journal of colloid and interface science*, 212(2), 212-219.

Mullally, M. M., Meisel, H., & FitzGerald, R. J. (1997). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *International Dairy Journal*, 7(5), 299-303.

Mulero J., Zafrilla P., Martínez Adela., Leal M., Abellán J. (2011). Péptidos bioactivos. Clínica e investigación en Arteriosclerosis. Vol. 23. Núm.05.

Muro C, Álvarez F., Riera R, Arana C., Téllez J. (2011). Production and functionality of active peptides from milk. *Food Science and Technology International* 17: 293-317.

Muro, C., Riera, F., & Fernández, A. (2013). Advancements in the fractionation of milk biopeptides by means of membrane processes. *Bioact Food Pept Health Dis*, 241.

Muro, U. C., Riera, R. F., Alvarado, P. Y. (2014). Encapsulation of whey proteins. In *Whey Proteins Functional Properties Production and Health Benefits*; Wyatt, M., Nova publishers: New York, NY, USA. pp. 75-116.

Neira-Carrillo, A., Muñoz, D. Y., Zazzali, P. A., Marini, Y. A., Vilches, S. V., & Palma, R. E. (2013). Encapsulación de biomoléculas usando polímeros naturales: “un nuevo enfoque en la entrega de fármacos en medicina”. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 28(2), Pág-31.

NMX-F-066-S-1978. Determinación de cenizas en alimentos. Investigación en línea el día 23/02/2013. <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-066-S-1978.PDF>

NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos. Investigación en línea el día 23/02/2013. <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-317-S1978.PDF>

NMX-F-420-1982. Determinación de acidez en leche fluida. Investigación en línea el día 23/02/2013 <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-420-S-1982.PDF>

NMX-F-424-S-1982. Determinación de la densidad en leche fluida. Investigación en línea el 23/02/2013 <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-424-S-1982.PDF>
NMX-F-426-1982. Determinación de sólidos totales en leche fluida. Investigación en línea el 28/10/2014 <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-426-1982.PDF>

Nnamonu, L. A., Sha'Ato, R., & Onyido, I. (2012). Alginate Reinforced Chitosan and Starch Beads in Slow Release Formulation of Imazaquin Herbicide—Preparation and Characterization. *Materials Sciences and Applications*, 3(08), 566.

Norris, R., Poyarkov, A., O'Keeffe, M. B., & FitzGerald, R. J. (2014). Characterisation of the hydrolytic specificity of *Aspergillus niger* derived prolyl endoproteinase on bovine β -casein and determination of ACE inhibitory activity. *Food chemistry*, 156, 29-36.

Nurminen, M. L., Sipola, M., Kaarto, H., Pihlanto-Leppälä, A., Piilola, K., Korpela, R. & Vapaatalo, H. (2000). α -Lactophin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life sciences*, 66(16), 1535-1543.

Olmos, J., & Paniagua-Michel, J. (2015). *Bacillus subtilis* a potential probiotic Bacterium to formulate functional feeds for aquaculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 2015.

O'Neill, G. J., Egan, T., Jacquier, J. C., O'Sullivan, M., & O'Riordan, E. D. (2015). Kinetics of immobilisation and release of tryptophan, riboflavin and peptides from whey protein microbeads. *Food chemistry*, 180, 150-155.

Otte, J., Shalaby, S. M., Zakora, M., & Nielsen, M. S. (2007). Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from α -lactalbumin and β -casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. *International Dairy Journal*, 17(12), 1460-1472.

Panesar P., Kennedy J., Gandhi and Bunko K., (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry* 105: 1-14.

Pihlanto-Leppälä, A. (2001). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *trends in Food Science & technology*, 11(9), 347-356.

Prieto, C. A. P. (2007). Diseño y optimización de un reactor de membrana discontinuo para la hidrólisis enzimática de proteínas. Editorial de la Universidad de Granada.

Quirós A., (2007). Leches fermentadas con actividad antihipertensiva: Identificación de péptidos y evaluación de su biodisponibilidad. Tesis doctoral. Universidad autónoma de Madrid, Facultad de ciencias.

Rao, P. S., Bajaj, R. K., Mann, B., Arora, S., & Tomar, S. K. (2016). Encapsulation of antioxidant peptide enriched casein hydrolysate using maltodextrin–gum arabic blend. *Journal of food science and technology*, 53(10), 3834-3843.

Rektor, A., & Vatai, G. (2004). Application of membrane filtration methods for must processing and preservation. *Desalination*, 162, 271-277.

Romero de la Cruz A. (2014). Aprovechamiento de suero lácteo para la obtención de productos enriquecidos en aminoácidos biológicamente activos. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Toluca.

Romo-Sánchez, S., Camacho, C., Ramirez, H. L., & Arévalo-Villena, M. (2014). Immobilization of Commercial Cellulase and Xylanase by Different Methods Using Two Polymeric Supports. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5(06), 517.

Ronquillo, R., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., Reyes-Grajeda, J. P. & García-Garibay, M. (2012). Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *International dairy journal*, 26(2), 147-154.

Rizzo, L., Di Gennaro, A., Gallo, M., & Belgiorno, V. (2008). Coagulation/chlorination of surface water: A comparison between chitosan and metal salts. *Separation and Purification Technology*, 62(1), 79-85.

Saha, A. K., & Ray, S. D. (2013). Effect of cross-linked biodegradable polymers on sustained release of sodium diclofenac-loaded microspheres. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(4), 873-888.

Sanmartín B., (2010). Aprovechamiento de suero de quesería de origen caprino mediante la obtención de concentrados de proteínas séricas y subproductos de clarificación. Estudio de sus propiedades tecnológicas. Tesis Doctoral Universidad de Santiago de Compostela Campus de Lugo.

Segale, L., Giovannelli, L., Mannina, P., & Pattarino, F. (2016). Calcium Alginate and Calcium Alginate-Chitosan Beads Containing Celecoxib Solubilized in a Self-Emulsifying Phase. *Scientifica*, 2016.

Selgas, A. (1990), Procesos de membrana y su aplicación en el tratamiento del lactosuero. Alimentación: *Equipos y tecnología*, vol 9, no 105, pp 117-123.

Silva, S. V., & Malcata, F. X. (2005). Caseins as source of bioactive peptides. *International dairy journal*, 15(1), 1-15.

Spellman, D., McEvoy, E., O'cuinn, G., & FitzGerald, R. J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13(6), 447-453.

Sponton, O. E., Perez, A. A., Carrara, C., & Santiago, L. G. (2014). Effect of limited enzymatic hydrolysis on linoleic acid binding properties of β -lactoglobulin. *Food chemistry*, 146, 577-582.

Taqieddin, E., & Amiji, M. (2004). Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules. *Biomaterials*, 25(10), 1937-1945.

Takka, S., & Gürel, A. (2010). Evaluation of chitosan/alginate beads using experimental design: formulation and in vitro characterization. *Aaps Pharmscitech*, 11(1), 460-466.

Teijon R. J. Ma., (2001). Bioquímica Estructural. Ed. Tebar, p 54.

Thakkar, H., & Murthy, R. S. R. (2005). El polietilenglicol como agente antiagregante en la preparación de microesferas de gelatina con celecoxib. *Ars pharmaceutica*, 46(1), 19-34.

Tovar J. X., Arana C. A., Téllez J. A., Abreu C. A., Muro U. C. R. (2012). Traditional methods for whey protein isolation and concentration: effects on nutritional properties and biological activity. *Journal of the Mexican Chemical society*, 56(4), 355-377.

Torruco-Uco, J. G., Domínguez-Magaña, M. A., Davila-Ortiz, G., Martínez-Ayala, A., Chel-Guerrero, L. A., & Betancur-Ancona, D. A. (2008). Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: una revisión antihypertensive peptides, an alternative for treatment of natural origin: a review. *CYTA-Journal of Food*, 6(2), 158-168.

Valencia D. E., Ramírez C. M. L., 2009. La industria de la leche y la contaminación del agua. *Ciencia y Cultura*, Vol. 16, Núm. 73, p. 27-31.

Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., & Korhonen, H. (2007). Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), 106-115.

Wang, X., Zhu, K. X., & Zhou, H. M. (2011). Immobilization of glucose oxidase in alginate-chitosan microcapsules. *International journal of molecular sciences*, 12(5), 3042-3054.

Yamada, A., Sakurai, T., Ochi, D., Mitsuyama, E., Yamauchi, K., & Abe, F. (2013). Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from bovine casein. *Food chemistry*, 141(4), 3781-3789.

Yang, S., Mao, X. Y., Li, F. F., Zhang, D., Leng, X. J., Ren, F. Z., & Teng, G. X. (2012). The improving effect of spray-drying encapsulation process on the bitter taste and stability of whey protein hydrolysate. *European Food Research and Technology*, 235(1), 91-97.

Yu, C. Y., Yin, B. C., Zhang, W., Cheng, S. X., Zhang, X. Z., & Zhuo, R. X. (2009). Composite microparticle drug delivery systems based on chitosan, alginate and pectin with improved pH-sensitive drug release property. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 68(2), 245-249.

Zhang, Z., Zhang, R., Zou, L., & McClements, D. J. (2016). Protein encapsulation in alginate hydrogel beads: Effect of pH on microgel stability, protein retention and protein release. *Food Hydrocolloids*, 58, 308-315.

Zia, F., Anjum, M. N., Saif, M. J., Jamil, T., Malik, K., Anjum, S., & Zia, M. A.
(2017). Alginate-Poly (Ethylene) Glycol and Poly (Ethylene) Oxide Blend Materials.
In *Algae Based Polymers, Blends, and Composites* (pp. 581-601).