



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

**CARACTERIZACIÓN METAGENÓMICA Y PEPTIDÓMICA DE LECHE
FERMENTADA CON GRANOS DE KÉFIR**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:



MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

APROBADA



Presenta:

KARLA ORTIZ TRÁPALA

Bajo la supervisión de: Consuelo S.O. Lobato Calleros, Dra.



Chapingo, Estado de México, diciembre de 2023

CARACTERIZACIÓN METAGENÓMICA Y PEPTIDÓMICA DE LECHE FERMENTADA CON GRANOS DE KÉFIR

Tesis realizada por C. Karla Ortiz Trápala bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

DIRECTOR:  _____

Dra. Consuelo S.O. Lobato Calleros

ASESOR:  _____

Dra. Landy Hernández Rodríguez

ASESOR:  _____

Dr. Eleazar Aguirre Mandujano

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS USADAS	viii
DEDICATORIAS	ix
AGRADECIMIENTOS	x
DATOS BIOGRÁFICOS.....	xii
RESUMEN GENERAL	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	14
Literatura citada.....	16
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	20
2.1 Literatura citada.....	20
2.1.1 Leches fermentadas	20
2.2 Kéfir	21
2.3. Metagenómica	22
2.4 Péptidos bioactivos en leches fermentadas.....	22
2.4.1 Péptidos con actividad antioxidante.....	23
2.5 Literatura citada.....	24
3. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DE LECHE FERMENTADAS CON GRANOS DE KÉFIR	28
3.1 Resumen	28
3.2 Introducción.....	30
3.3 Materiales y métodos	31
3.3.1 Ubicación del trabajo	31
3.3.2 Materiales	31
3.3.3 Acondicionamiento de la muestra.....	31
3.3.2 Análisis fisicoquímicos	31

3.4 Análisis microbiológico	32
3.5 Análisis estadístico	33
3.6 Resultados y discusión	33
3.6.1 Análisis fisicoquímicos	33
3.6.2 Análisis microbiológico	35
3.7 Conclusiones	36
3.8 Agradecimientos	36
3.9 Literatura citada	37
4. ANÁLISIS METAGENÓMICO SHOTGUN DE LECHES FERMENTADAS ...	40
4.1 Resumen	40
4.2 Introducción	42
4.3 Materiales y métodos	43
4.3.1 Extracción de ADN	43
4.3.2 Secuenciación por Shotgun	44
4.3.3 Análisis bioinformático	44
4.4 Resultados y discusión	45
4.4.1 Calidad de extracción de ADN	45
4.4.2 Abundancia relativa	46
4.4.3 Reconstrucción de rutas metabólicas (KEGG)	48
4.5 Conclusiones	52
4.6 Agradecimientos	52
4.7 Literatura citada	52
5. SECUENCIACIÓN DE PÉPTIDOS EN LECHES FERMENTADAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC-MS/MS)	55
5.1 Resumen	55
5.2 Introducción	57
5.3 Materiales y métodos	58
5.3.1 Obtención de extractos peptídicos solubles en agua	59
5.3.2 Determinación de proteína soluble por el método de Lowry	59

5.3.3 Determinación de actividad antioxidante	60
5.3.4 Separación de proteínas por peso molecular (SDS-PAGE).....	61
5.3.5 Digestión de proteínas en gel	61
5.3.6 Secuenciación de péptidos mediante (LC-MS/MS)	62
5.3.7 Análisis de datos.....	63
5.4 Resultados y discusión.....	63
5.4.1 Proteína soluble Lowry	63
5.4.2 Actividad antioxidante	63
5.4.3 Pesos moleculares (SDS-PAGE).....	67
5.4.4 Caracterización de péptidos	68
5.5 Conclusiones.....	80
5.6 Agradecimientos.....	80
5.7 Literatura citada.....	80
6. CONCLUSIONES GENERALES.....	85

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Análisis fisicoquímico de cuatro LF.	35
Cuadro 2. Determinación cuantitativa de levaduras y BAL en cuatro leches fermentadas.	36
Cuadro 3. Calidad e integridad de extracción de ADN de LF.....	45
Cuadro 4. Proteínas encontradas en LF con granos de kéfir en Scaffold 5.	69
Cuadro 5. Péptidos más abundantes presentes en seis proteínas de LF.	71
Cuadro 6. Propiedades Fisicoquímicas de péptidos encontrados por LC-MS/MS	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales Géneros presentes en LFA y LFD.	47
Figura 2. Principales Especies presentes en LFA y LFD.	48
Figura 3. Ruta metabólica de principales aminoácidos en leches fermentadas A y D, a través de la plataforma KEGG mapper (https://www.genome.jp/kegg/mapper/reconstruct.html)	50
Figura 4. Ruta metabólica de (riboflavina), a través de la plataforma KEGG mapper (https://www.genome.jp/kegg/mapper/reconstruct.html)	51
Figura 5. Inhibición de radical DPPH de péptidos de cuatro leches fermentadas.	65
Figura 6. Inhibición de radical ABTS de péptidos en cuatro leches fermentadas.	66
Figura 7. Distribución de pesos moleculares de extractos peptídicos solubles en agua.....	67
Figura 8. Péptidos presentes en las proteínas β -lactoglobulina ID B5B0D4 y β -lactoglobulina ID P02754.	73
Figura 9. Peptidos encontrados en proteínas: α -lactoalbúmina ID A0A452D134(+1) y Variante D- β -lactoglobulina (fragmento) ID O77777.	75
Figura 10. Péptidos con actividad biológica encontrados en proteínas β -caseína con ID A0A145YPD8 y A0A0M4FTE5	77

ABREVIATURAS USADAS

°C: Grados Celsius

aa: aminopácidos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AOAC: Association of Analytical Communities

ARN: Ácido ribonucleico

DCA: Diseño completamente al azar

Ec: Ecuación

g: Gramo

h: Hora

LC-MS/MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem

m/z: Masa/carga

NGS: Secuenciación de nueva generación

UFC: Unidades formadoras de colonia

DEDICATORIAS

A mis padres Edmundo y Rebeca, quienes han sido los mejores maestros que la vida me ha dado, son mi mayor apoyo y fuente de inspiración. Gracias por su amor incondicional, apoyo, comprensión y aliento. Este logro es tributo a su amor infinito.

A mis hermanas Fátima y Victoria, quienes siempre me escuchan y me brindan su apoyo incondicional. Gracias por llenar mi vida de risa, amor y no dejarme caer en los momentos difíciles, gracias por ser mi pilar.

A mi abuelo Carlos, cuyas historias, consejos, apoyo y cariño han sido inspiración para luchar por el cumplimiento de mis metas. Gracias por enseñarme que la imaginación e ingenio no tienen límite, gracias por ser fuente de fortaleza e inspiración.

A mi tía Eldi, quien siempre está pendiente de mí, cuyas palabras de aliento nunca faltan, Gracias por tu cariño.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, especialmente al Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria perteneciente al Departamento de Ingeniería Agroindustrial, gracias por brindarme las herramientas necesarias para mi crecimiento académico.

Igualmente agradezco al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnologías. (CONAHCYT).

A la Dra. Consuelo Lobato Calleros, por su dirección, apoyo y respaldo en el desarrollo de esta investigación.

A la Dra Landy Hernández Rodríguez, por su inagotable apoyo, aportaciones y orientación para el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Eleazar Aguirre Mandujano y a la Dra. Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez, por sus conocimientos compartidos.

A la Dra. Diana Itzel López Monterrubio, por sus consejos, apoyo y conocimientos compartidos.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por permitirme utilizar las instalaciones del laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia. Al Q.F.B. Adalberto Gomez Cruz y al M.C Armando Santos Moreno por el conocimiento compartido y por facilitarme el material para desarrollar parte de este trabajo.

A la M.C Lorena Hernández Orihuela perteneciente al laboratorio Universitario de Proteómica y al M. en B. Juan Elías Olivares Grajales miembro del laboratorio 19 de Biología Molecular de Plantas, a la Dra. Leticia Vega Alvarado de la Unidad Universitaria de Secuenciación masiva y bioinformática y al cluster Teopanzolco.

Laboratorios ubicados en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBt- UNAM).

A Memo, Gracias por los consejos, el apoyo, aprendizaje y por todas las vivencias que compartimos, ni mitz neki.

“Oh, I get by with a Little help from my Friends”. A mis amigas de toda la vida Lupita, Chio, Tere, Anabella, Core y Karla Joseline. Gracias por estar siempre presentes, por ser mi refugio en los momentos difíciles y por su increblante amistad.

“But we are Young, we run Green”. A los amigos que me regaló la maestría, Chio, Noé, Dian y Jan, gracias por todos los aprendizajes, desafíos y risas que compartimos en esta aventura, atesoro mucho su amistad.

A la Familia García García por su cariño y apoyo. A Net, gracias por tu amistad, apoyo, por escucharme y darme ánimos cuando sentía que todo estaba cuesta arriba.

A mis compañeros de generación 2021-2023 y Bibi, Mariana, Metz y Willi de la generación 2022-2024, gracias por su amistad.

A Vanne Zarzosa, por sus consejos y ayuda durante mi estancia en el IBt.

A la Maestra Ofelia Buendía, a Claudia Cisneros, Dr. Vicente, M.C. Víctor Rivera y a M.C. Nancy Toriz, gracias por su amistad y apoyo.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Karla Ortiz Trápala

Fecha de nacimiento: 22 de febrero 1996

Lugar de nacimiento: Zacatlán, Puebla, México

CURP: OITK960222MPLRRR00

Cédula profesional: 12614871



Desarrollo académico:

Champion (2023- 2024)

Miembro activo y champion de la Microbiology Society

Carrera profesional (2014- 2018)

Ingeniería en Industrias Alimentarias del Instituto Tecnológico Superior de la Sierra Norte de Puebla (ITSSNP). Titulación por tesis y premio al mérito académico.

Preparatoria (2011-2014)

Centro Escolar Presidente Juan N. Méndez

RESUMEN GENERAL

CARACTERIZACIÓN METAGENÓMICA Y PEPTIDÓMICA DE LECHE FERMENTADA CON GRANOS DE KÉFIR

Las leches fermentadas (LFs) forman parte del grupo de alimentos funcionales ya que contienen microorganismos con potencial probiótico. El kéfir es una antigua bebida láctea a la cual se le atribuyen beneficios al ser consumido, v.g la reducción de síntomas asociados a la intolerancia de la lactosa y estimulación del sistema inmunológico. Se caracterizaron fisicoquímicamente, metagenómica y peptidómicamente cuatro leches fermentadas (LFA, LFB, LFC y LFD) con granos de kéfir. Los parámetros de acidez variaron de 3.76 a 3.82 %. Después de la fermentación (48 h), las BAL estuvieron presentes de 7.25 y 11.13 log₁₀ UFC · mL⁻¹ y las levaduras de 6.05 y 7.93 log₁₀ UFC · mL⁻¹. Así mismo, se estudió la microbiota de LFA y LFD mediante la técnica de secuenciación metagenómica *shotgun*, la cual reveló 77 géneros de microorganismos, donde los más representativos fueron *Acetobacter* (73.8 %), *Lactobacillus* (19.6 %), *Lentilactobacillus* (3.9 %), *Lactococcus* (0.76 %), de igual manera las especies con mayor abundancia fueron *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Acetobacter orientalis*, *Lactobacillus helveticus*, *Staphylococcus aureus*, *Acetobacter syzygii*, *Acetobacter okinawensis*, *Lentilactobacillus kefiri* y *Lactococcus lactis*. El perfil peptídico utilizando la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) mostró la presencia de 3691 péptidos. Las principales actividades biológicas, determinadas in silico, fueron antiinflamatoria, inhibidora de ACE, antibacterial, inhibidor de DPP – III y DPP – IV, antitrombótico, anticancerígeno y antioxidante. Igualmente se evaluó la actividad antioxidante in vitro con los ensayos ABTS y DPPH; LFB demostró mayor porcentaje de actividad inhibidora de radicales libres (55.45 %). Los resultados obtenidos demuestran que, a las 48 de fermentación, los microorganismos presentes en la leche fermentadas liberan péptidos con actividad biológica.

Palabras clave: Leche fermentada, metagenómica, péptidos, actividad antioxidante.

Tesis de Maestría en Ciencia, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Karla Ortiz Trápala

Director de Tesis: Dra. Consuelo S.O. Lobato Calleros.

ABSTRACT

METAGENOMIC AND PEPTIDOMIC CHARACTERIZATION OF MILK FERMENTED WITH KEFIR GRAINS

Fermented milks (LFs) are part of the group of functional foods since they contain microorganisms with probiotic potential. Kefir is an ancient dairy drink to which benefits are attributed when consumed, e.g. the reduction of symptoms associated with lactose intolerance and stimulation of the immune system. Four fermented milks (LFA, LFB, LFC and LFD) with kefir grains were characterized physiochemically, metagenomically and peptidomically. The acidity parameters varied from 3.76 to 3.82%. After fermentation (48 h), the BAL were present of 7.25 and 11.13 log₁₀ CFU · mL⁻¹ and the yeasts of 6.05 and 7.93 log₁₀ CFU · mL⁻¹. Likewise, the microbiota of LFA and LFD was studied using the *shotgun* metagenomic sequencing technique, which revealed 77 genera of microorganisms, where the most representative were *Acetobacter* (73.8%), *Lactobacillus* (19.6%), *Lentilactobacillus* (3.9%), *Lactococcus* (0.76%), likewise the species with the highest abundance were *Lactobacillus kefiranoformis*, *Acetobacter orientalis*, *Lactobacillus helveticus*, *Staphylococcus aureus*, *Acetobacter syzygii*, *Acetobacter okinawensis*, *Lentilactobacillus kefir* and *Lactococcus lactis*. The peptide profile by the liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) technique showed the presence of 3691 peptides. The main biological activities, determined *in silico*, were anti-inflammatory, ACE inhibitor, antibacterial, DPP-III and DPP-IV inhibitor, antithrombotic, anticancer and antioxidant). The antioxidant activity was also evaluated *in vitro* with the ABTS and DPPH tests; LFB showed a higher percentage of free radical inhibitory activity (55.45%). The results obtained show that, at 48 of fermentation, the microorganisms present in fermented milk release peptides with biological activity.

Key words: Fermented milk, metagenomics, peptides, antioxidant activity.

Thesis.Maestria en Ciencia, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Karla Ortiz Trápala

Advisor: Dr. Consuelo S.O. Lobato Calleros.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La fermentación de la leche es una actividad que se ha desarrollado desde hace 10 000 años, con el sedentarismo y la domesticación de los animales (Buttris, 1997; Khalil et al., 2023), surgieron productos como el yogur, kéfir y algunos quesos, los cuales, además de tener un sabor agradable y cumplir la necesidad de saciar el hambre, se han utilizado durante miles de años como tratamiento para prevenir y reducir síntomas de algunas enfermedades gastrointestinales, ya que se cree que tienen efectos benéficos para la salud humana, mismos que se asocian a la microbiota y los procesos bioquímicos que ésta efectúa en la fermentación. Los productos lácteos fermentados son producidos principalmente en regiones rurales.

La fermentación de la lactosa por acción de bacterias ácido lácticas (BAL) nativas de la leche o mediante cultivos iniciadores específicos cumple un papel esencial en la elaboración de gran parte de los productos lácteos tradicionales (Kim y Ku, 2018).

Gran parte de los productos lácteos fermentados tradicionales surgen a causa de la fermentación de la lactosa por acción de bacterias ácido lácticas (BAL) nativas de la leche o mediante cultivos iniciadores específicos (Kim y Ku, 2018). El kéfir es una bebida de origen Cáucaso que se consume en todo el mundo, y se produce mediante la inoculación de leche con granos de kéfir. El estudio de los granos de kéfir ha revelado la composición de su microbiota conformada por bacterias ácido lácticas, hongos y levaduras (Rattray y O'Connell, 2011). Los microorganismos del kéfir producen vitaminas, degradan proteínas e hidrolizan lactosa, lo que da como resultado un alimento nutritivo y digerible.

Anteriormente, para estudiar la composición microbiológica de los alimentos, se empleaban técnicas dependientes de cultivo, sin embargo, con el surgimiento de las ciencias ómicas y las herramientas bioinformáticas ahora es posible conocer la microbiota mediante técnicas independientes de cultivo (Kahraman-Ilikkan y Bagdat, 2021; Lynch et al., 2021).

La secuenciación metagenómica *shotgun* proporciona una resolución taxonómica de nivel especie hasta cepa y predice el potencial funcional del metagenoma (Niccum et al., 2020; You et al., 2022; Walsh et al., 2018).

La proteómica es otra herramienta de las ciencias ómicas, la cual tiene diversos enfoques que permiten tener una visión cualitativa y cuantitativa del proteoma de los alimentos (Gagnaire y Jan, 2017; Ibáñez et al., 2013). Las proteínas de los productos lácteos fermentados actúan como proveedoras y sustrato para las enzimas dentro del proceso de proteólisis de la leche y la degradación de proteínas bacterianas. Así mismo, las bacterias presentes en estos alimentos son productoras de compuestos bioactivos. Los microorganismos del kéfir producen vitaminas, degradan proteínas e hidrolizan lactosa, lo que da como resultado un alimento nutritivo y digerible (Konuspayeva et al., 2023).

En la presente investigación se planteó la siguiente hipótesis: la leche fermentada con granos de kéfir presentará UFC · mL⁻¹ aceptables de BAL, así como péptidos con actividad biológica para considerarse como alimento probiótico. Por consiguiente, el objetivo de esta investigación fue caracterizar fisicoquímicamente, metagenómicamente por secuenciación *shotgun* y peptidómicamente la leche fermentada con granos de kéfir.

Para lograr el objetivo general, se desarrollaron los siguientes objetivos específicos: a) determinar las características (proteína, grasa, humedad, sólidos totales, pH y acidez), b) extraer ADN de las leches fermentadas, c) realizar la secuenciación metagenómica *shotgun* del producto lácteo fermentado, d) Identificar los péptidos bioactivos de las leches fermentadas mediante LC-MS/MS.

Este documento consta de cinco capítulos. El primero presenta una introducción general acerca de las leches fermentadas; el segundo muestra el estado del arte referente a leches fermentadas y ciencias ómicas; el tercer capítulo está conformado por el desarrollo de metodologías y resultados referentes a la caracterización fisicoquímica de las leches fermentadas. En el cuarto capítulo se identificaron los géneros y especies más abundantes en las leches fermentadas; y por último, en el quinto capítulo, se determinaron los péptidos bioactivos liberados en el proceso de fermentación y la actividad antioxidante *in vitro*.

Literatura citada

- Bengoa, A. A., Iraporda, C., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2018). Kefir microorganisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. *Journal of Applied Microbiology*, 126(3), 686-700. <https://doi.org/10.1111/jam.14107>
- Buttriss, J. (1997). Nutritional properties of fermented milk products. *International Journal of Dairy Technology*, 50(1), 21-27. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1997.tb01731.x>
- Ebner, J., Arslan, A. A., Fedorova, M., Hoffmann, R., Küçükçetin, A., & Pischetsrieder, M. (2015). Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or kefir grains. *Journal of Proteomics*, 117, 41-57. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.01.005>
- Gagnaire, V., & Jan, G. (2017). Proteomics of fermented milk products. En *Elsevier eBooks* (pp. 361-382). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804007-2.00022-9>
- Hameed, A. M., Elkhtab, E., Mostafa, M., Refaey, M., Hassan, M. A., El-Naga, M. Y. A., ... & Aly, A. A. (2021). Amino acids, solubility, bulk density and water holding capacity of novel Freeze-Dried cow's skimmed milk fermented with potential probiotic *Lactobacillus plantarum* BU-EG5 and *Lactobacillus rhamnosus* BU-EG6. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(8), 103291. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103291>
- Hyatt, D. R., Chen, G. L., LoCasio, P. F., Land, M., Larimer, F. W., & Hauser, L. (2010). Prodigal: Prokaryotic Gene Recognition and Translation Initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119>

- Ibáñez, C., Simó, C., García-Cañas, V., Cifuentes, A., & Castro-Puyana, M. (2013). Metabolomics, Peptidomics and Proteomics Applications of Capillary electrophoresis-mass Spectrometry in Foodomics: A review. *Analytica Chimica Acta*, 802, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.07.042>
- Kahraman-Ilikkan, Ö., & Bağdat, E. Ş. (2021a). Comparison of bacterial and fungal biodiversity of Turkish kefir grains with high-throughput metagenomic analysis. *LWT*, 152, 112375. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112375>
- Kahraman-Ilikkan, Ö., & Bağdat, E. Ş. (2021b). Comparison of bacterial and fungal biodiversity of Turkish kefir grains with high-throughput metagenomic analysis. *LWT*, 152, 112375. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112375>
- Kanehisa, M. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kanehisa, M., & Sato, Y. (2019). KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences. *Protein Science*, 29(1), 28-35. <https://doi.org/10.1002/pro.3711>
- Khalil, R. A., Yvon, S., Couderc, C., Jard, G., Rammouz, R. E., Nakhoul, P. A., Eutamène, H., Ayoub, M., & Tormo, H. (2023). Traditional fermented milk products of Eastern Mediterranean countries: a cultural heritage to preserve. *International Dairy Journal*, 147, 105768. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105768>
- Kim, D., & Ku, S. (2018). Bacillus cellulase molecular cloning, expression, and surface display on the outer membrane of Escherichia coli. *Molecules*, 23(2), 503. <https://doi.org/10.3390/molecules23020503>
- Konuspayeva, G., Baubekova, A., Akhmetsadykova, S., & Faye, B. (2023). Traditional dairy fermented products in Central Asia. *International Dairy Journal*, 137, 105514. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105514>
- Lynch, K. M., Wilkinson, S., Daenen, L., & Arendt, E. K. (2021). An update on water kefir: microbiology, composition and production. *International Journal of Food Microbiology*, 345, 109128. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109128>
- Niccum, B. A., Kastman, E. K., Kfoury, N., Robbat, A., & Wolfe, B. E. (2020b). Strain-Level diversity impacts cheese rind microbiome assembly and function. *MSystems*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/msystems.00149-20>

- Papagianni, M. (2012). Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 3(4), e201210003. <https://doi.org/10.5936/csbj.201210003>
- PoSIt | the Open-Source Data science Company. (2023, 13 noviembre). Posit. <http://www.posit.co/>
- Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun Metagenomics, From sampling to analysis. *Nature Biotechnology*, 35(9), 833-844. <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>
- Rattray, F. P., & O'Connell, M. J. (2011). Fermented milks | Kefir. Michelle Colgrave (Ed.) In *Elsevier eBooks* (pp. 518-524). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374407-4.00188-6>
- Tenorio-Salgado, S., Castelán-Sánchez, H. G., Dávila-Ramos, S., Huerta-Saqueró, A., Rodríguez-Morales, S., Merino, E., ... & Lizama-Uc, G. (2021). Metagenomic analysis and antimicrobial activity of two fermented milk kefir samples. *MicrobiologyOpen*, 10(2). <https://doi.org/10.1002/mbo3.1183>
- Turek, K., & Wszolek, M. (2022). Effect of walnut oil on the fatty acid content of probiotic kefir produced either with kefir grains or kefir starter cultures. *International Dairy Journal*, 127, 105290. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105290>
- Villarreal-Morales, S., Montañez, J., Aguilar, C. N., & Rodríguez-Herrera, R. (2018). Metagenomics of traditional beverages. En *Elsevier eBooks* (pp. 301-326). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811443-8.00011-6>
- Walsh, A. M., Crispie, F., Kilcawley, K. N., O'Sullivan, Ó., O'Sullivan, M. G., Claesson, M. J., & Cotter, P. D. (2016). Microbial succession and flavor production in the fermented dairy beverage kefir. *MSystems*, 1(5). <https://doi.org/10.1128/msystems.00052-16>
- Walsh, A. M., Crispie, F., O'Sullivan, Ó., Finnegan, L., Claesson, M. J., & Cotter, P. D. (2018). Species classifier choice is a key consideration when analysing low-complexity food microbiome data. *Microbiome*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0437-0>
- Wang, H., & Guo, M. (2023). Microbiological profiles, physiochemical properties and volatile compounds of goat milk kefir fermented by reconstituted kefir grains. *LWT*, 183, 114943. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114943>

- Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczyński, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22(3), 474-481. <https://doi.org/10.2144/97223st01>
- Yeğın, Z., Yurt, M. N. Z., Taşbaşı, B. B., Acar, E. E., Altunbaş, O., Uçak, S., Özalp, V. C., & Sudağıdan, M. (2022). Determination of bacterial community structure of Turkish kefir beverages via metagenomic approach. *International Dairy Journal*, 129, 105337. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105337>
- You, L., Yang, C., Jin, H., Kwok, L., Sun, Z., & Zhang, H. (2022a). Metagenomic features of traditional fermented milk products. *LWT*, 155, 112945. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112945>
- You, L., Yang, C., Jin, H., Kwok, L., Sun, Z., & Zhang, H. (2022b). Metagenomic features of traditional fermented milk products. *LWT*, 155, 112945. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112945>
- Zhang, X., Wang, Y., Jia, H., Wang, Z., Gao, Z., Luo, Y., Sheng, Q., Yuan, Y., & Yue, T. (2022). Metagenomic analysis of microflora structure and functional capacity in probiotic tibetan kefir grains. *Food Research International*, 151, 110849. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110849>

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Literatura citada

2.1.1 Leches fermentadas

Los productos lácteos fermentados han sido consumidos desde hace 10 000 años. Hipócrates fundador de la medicina racional y Galeno quien fue uno de los médicos más destacados de la antigüedad, notaron que el consumo de leche fermentada aliviaba desórdenes estomacales e intestinales y desde ese entonces han sido consumidas no solo como alimento, sino como que también como proveedoras de salud intestinal. Las leches fermentadas fueron definidas por el Codex Alimentarius (2018) como un producto lácteo obtenido por la fermentación de la leche por acción de microorganismos iniciadores viables, activos y abundantes, los cuales generan una disminución de pH (Abi Khalil et al., 2023; Domínguez et al., 2014; Mayo et al., 2010; Obermany Libudzisz, 1998).

El yogur y el kéfir son unas de las bebidas lácteas fermentadas más comunes, los cuales se ubican dentro de la clasificación de alimentos funcionales ya que en su composición se encuentran probióticos y prebióticos y en el proceso de fermentación están involucrados un gran número de BAL y levaduras.

La Organización Mundial de la Salud(OMS) en 2002 definió a los probióticos como microorganismos vivos que se originan a partir de una matriz alimentaria y confieren un beneficio para la salud del huésped cuando se administran en cantidades adecuadas, ya sea en cepas únicas o combinadas (Ahn, Lee, G., Lee, W. 2023; Zendeboodi, et al., 2020); los iniciadores más comunes en la elaboración de yogur son *Lactobacillus delbrueckii* spp. *Bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, sin embargo, también se emplean algunos otros

probióticos como *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium animalis ssp. Lactis*.

Por otro lado, algunos grupos de microorganismos presentes en los cultivos iniciadores (granos de kéfir) son: *Lactobacillus paracasei*, *L. kefiranofaciens*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Lactococcus lactis* por mencionar algunos. Estos consorcios microbianos promueven propiedades funcionales que a su vez benefician a la salud del consumidor (Da Silva et al., 2017; Delgado et al., 2020).

2.2 Kéfir

El kéfir es una bebida láctea fermentada originaria de las montañas del Cáucaso, el Tíbet o Mongolia. Fue descubierta por los caucásicos ya que se percataron de que la leche fresca al ser transportada en bolsas de cuero ocasionalmente fermentaba la leche convirtiéndola en una bebida efervescente (Irigoyen et al., 2005). La palabra kéfir es de origen turco “keyif” cuya traducción puede ser “sentirse bien”, “placer” y “buen sentimiento”, haciendo referencia a la sensación de bienestar que ésta genera posterior a su consumo.

El cultivo iniciador de ésta bebida es el kefirán y no es más que una matriz polimérica que alberga un consorcio rico de microorganismos (hongos, bacterias y levaduras), dentro de los cuales hay cuatro grupos microbianos dentro de los granos de kéfir: bacterias homofermentativas, heterofermentativas y levaduras asimiladoras de lactosa y no lactosa (Prado et al., 2015; Gentry et al., 2023), por ejemplo: *Lactobacillus paracasei*, *L. kefiranofaciens*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Lactococcus lactis*, *K.marxianus*, *K. lactis* subsp.lactis, *Debaryomyces hanseii* y *Dekkera anomala*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces pastorianus*, *Istria orientalis* y *Debaryomuces occidentalis*, por mencionar algunos. (Ding et al., 2022; Saygili et al., 2023).

La fermentación de lactosa por acción de estos microorganismos da lugar a la acidificación del producto, lo que previene el crecimiento de microorganismos que la deterioran. Usualmente, los granos de kéfir se inoculan a concentraciones de

2 a 8 % incubándose durante 18 a 24 h a 25 °C (Dallas et al., 2016; Otlés y Cagindi, 2003).

2.3. Metagenómica

La secuenciación de próxima generación o también llamadas de segunda generación (NGS) se refiere a la tecnología de secuenciación de ADN a gran escala que permite consultar el genoma completo (Alfaro, Sepulveda y Lyon, 2019). Esta tecnología ha favorecido el estudio de los sistemas biológicos, ya que los métodos dependientes de cultivo presentan dificultades en cuanto al crecimiento, reproducibilidad e identificación de algunos microorganismos, sin embargo, con la técnica de NGS se obtienen resultados en pocas horas y se requiere poca cantidad de ADN para secuenciar el genoma completo. Dos de los análisis metagenómicos comúnmente empleados para estudios metagenómicos y perfiles microbianos son 16 S rRNA análisis metagenómico de *shotgun*. El análisis de 16 S rRNA se basa en las diferencias de los ribosomas eucariotas y procariotas y únicamente está dirigido a la subunidad 30 S. En cuanto a la clasificación taxonomica se han caracterizado ocho grupos principales, desde dominio hasta especie y su objetivo principal es amplificar las regiones conservadoras que contienen las células bacterianas (V1-V9). Mientras que la secuenciación metagenómica *shotgun* secuencia el ADN genómico completo y tiene mayor cobertura genómica (Akacin, Ersoy, Dolucha y GÜ, 2022).

2.4 Péptidos bioactivos en leches fermentadas

Los péptidos son moléculas formadas por enlaces peptídicos. Los péptidos suelen proceder de los alimentos y tienen de dos a veinte aminoácidos (Meisen, y Fitz Gerald, 2003). Por otra parte, los péptidos bioactivos se definen como cadenas de aminoácidos que dentro de la proteína precursora se encuentran inactivos y tienen un impacto positivo en las funciones o condiciones del cuerpo y pueden contribuir a la salud desempeñando determinadas actividades biológicas que son manifestadas posterior a su liberación mediante hidrólisis química, enzimática o mediante proteólisis microbiana (Aguilar et al., 2017).

La actividad del péptido depende de su composición y secuencia de aminoácidos, algunos de los efectos benéficos que brindan a la salud son: antioxidante (Mendis et al., 2005; Suetsuna et al., 2000) antitrombótico (Shimizu et al., 2009), antihipertensivos (Jia et al., 2010) y antimicrobiano (McCann et al., 2006). Una de las técnicas empleadas para identificar y analizar proteínas es la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), la cual combina dos procesos distintos. El primer proceso se refiere a la cromatografía de líquidos, en la cual la muestra líquida pasa a través de una columna que contiene un material que separa las diferentes sustancias de la muestra, por otro lado, la parte del proceso denominada espectrometría de masas (MS) informa el peso molecular, estructura, identidad y el número de sustancias presentes en la muestra (NCI, 2021; Shi et al., 2023).

2.4.1 Péptidos con actividad antioxidante

Los radicales libres se producen fisiológicamente mediante reacciones usuales en el organismo y pueden ejercer diversas funciones como la defensa contra infecciones. Sin embargo, una cantidad excesiva de radicales libres pueden generar una sobre carga del sistema de defensa antioxidante endógeno, causando un daño oxidativo celular que puede ser precursor del desarrollo de diversas enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer (Halliwell, 1994; Jadhav et al., 1995).

Los antioxidantes exógenos son indispensables para conservar el equilibrio de oxidación y reducción, los antioxidantes pueden reducir el estrés oxidativo al momento de eliminar los radicales libres. Los péptidos bioactivos con potencial antioxidante obtenidos mediante la proteólisis no solo brinda nutrición, sino que también poseen una excelente actividad eliminadora de radicales libres (Zhang, Yu y Zhao, 2023).

El ensayo DPPH es un método muy utilizado para la detección de la capacidad antioxidante, el mecanismo de acción de éste método es que la presencia de antioxidantes con donación de hidrógeno conducirá a la transformación de DPPH

a DPPH-H no radical, ocasionando un cambio de color de púrpura a amarillo, la capacidad antioxidante es evaluada con el valor de la absorbancia a 517 nm y los resultados se estandarizan mediante la unidad equivalente de Trolox (Lang et al., 2024; Schaich, Tian y Xie, 2015).

Otro método para determinar la capacidad antioxidante es el ensayo de ABTS, éste es adecuado para antioxidantes líofilos e hidrofílicos. En este método el agente cromogénico es el ABTS, donde tras la reacción oxidativa con persulfato de potasio se genera el radical catiónico estable azul verdoso ABTS⁺. La eliminación de radicales por acción de los antioxidantes decolora el ABTS⁺, por ende, la absorbancia a 734 nm refleja la capacidad antioxidante y los resultados se comparan con el sistema estándar de control de Trolox y se expresan como capacidad antioxidante equivalente de Trolox (Lang et al., 2024).

2.5 Literatura citada

- Abi Khalil, R., Yvon, S., Couderc, C., Jard, G., El Rammouz, R., Abi Nakhoul, P., Eutamène, H., Ayoub, M.-J., y Tormo, H. (2023). Traditional fermented milk products of Eastern Mediterranean countries: A cultural heritage to preserve. *International Dairy Journal*, 147(105768), 105768. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105768>
- Aguilar-Toalá, J. E., Santiago-López, L., Peres, C. M., Peres, C., Garcia, H. S., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A. F., y Hernández-Mendoza, A. (2017). Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, 100(1), 65–75. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11846>
- Ahn, H., Lee, G., Lee, W., Kim, M., y Geun Lee, K. (2023). Evaluation of Probiotic and anti-inflammatory properties of bacteriocinogenic *Pediococcus acidilactici* HW₀₁ and *Leuconostoc citreum* HW₀₂ from malted barley. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 10, (49). <https://doi.org/10.1186/s40538-023-00425-4>
- Akaçin, İ., Ersoy, Ş., Doluca, O., & Güngörmüşler, M. (2022). Comparing the significance of the utilization of next generation and third generation sequencing technologies in microbial metagenomics. *Microbiological Research*, 264(127154), 127154. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127154>
- Alfaro, M. P., Sepulveda, J. L., & Lyon, E. (2019). Molecular testing for targeted therapies and pharmacogenomics. In Dasgupta A. & Sepulveda J.L. (Eds) the Clinical Laboratory (pp. 349–363). Elsevier.

- Alimetarius, C. (2003). Standard for fermented milks (CXS 243-2003).
- Dallas, D. C., Citerne, F., Tian, T., Silva, V. L., Kalanetra, K. M., Frese, S. A., Robinson, R. C., Mills, D. A., & Barile, D. (2016). Peptidomic analysis reveals proteolytic activity of kefir microorganisms on bovine milk proteins. *Food Chemistry*, 197, 273-284. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.116>
- Da Siva, D.F., Junior, N.N.T., Gomes, R.G., dos Santos Pozza, M.S., Ritten, M., y Matumoto Pinto, P.T. (2017). Physical, microbiological and rological properties of Probiotic yogurt supplemented with grape extract. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 1608-1615
- Delgado, F.P., Moreno, F.J., Corzo, N., y Nöbel, S. (2020). Physical propeties of synbiotic yogurts as affected by the acidification rate. *International Dairy Journal*, 105(104665), 104665. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104665>
- Diccionario de cáncer del NCI. (2011, febrero 2). Instituto Nacional del Cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/lc-ms>
- Ding, T., Deng, C., Shen, X., Bai, Y., Zhang, X., Liu, J., Yang, L., Yu, H., Xie, L., Chen, H., Mu, D., Qu, Y., Yang, H., Bao, A., Zhu, S., & Wang, D. (2022). Effect of a carbohydrate-rich beverage on rate of cesarean delivery in primigravidae with epidural labor analgesia: a multicenter randomized trial. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12884-022-04659-2>
- Domínguez. K. N., Cruz, A. E., Márquez. H. G., Gómez. L. C., García, M., y Rodríguez. G. M. (2014). El efecto antihipertensivo de las leches fermentadas. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(1), 58–65. [https://doi.org/10.1016/s0325-7541\(14\)70050-1](https://doi.org/10.1016/s0325-7541(14)70050-1)
- Genty, B., Cazón, P., y O'Brien, K. (2023). A comprehensive review of the production, beneficial properties, and applications of kefir, the kéfir grain exopolysaccharide. *International Dairy Journal*, 144(105691). <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105691>
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 344(8924), 721–724. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(94\)92211-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(94)92211-x)
- Irigoyen, A. (2005). Microbiological, Physicochemical, and sensory characyyeristics of kéfir during storage. *Food Chemisry*, 90(4), 613-620. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.021>
- Jadhav, S. J., Nimbalkar, S. S., Kulkarni, A. D., y Madhavi, D. L. (1995). Lipid oxidation in biological and food systems. In Madhavi, Deshpnde & Salunkhe (Eds) *Food antioxidants* (pp. 19-78). CRC Press.

- Jia, J. Ma, H., Zhao, W., Wang, Z., Tian, W., Luo, L., y He, R. (2010). The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chemistry*, 119(1), 336-342. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.06.036>
- Lang, Y., Gao, N., Zang, Z., Meng, X., Lin, Y., Yang, S., Yang, Y., Jin, Z., y Li, B. (2024). Classification and antioxidant assays of polyphenols: a review. *Journal of Future Foods*, 4(3), 193-204. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2023.07.002>
- Mayo B., Ammor, M. S., Delgado, S., y Alegría, Á. (2010). Fermented milk products. In Jyoti Prakash Tamang y Kasipathy Kailasapathy (Eds.) *Fermented foods and beverages of the world* (pp. 275-300). CRC press.
- McCann, K.B., Shiell, B.J., Michalski, W.P., Lee, A., Wan, J., Roginski, H., y Coventry, M.J. (2006). Isolation and characterization of a novel antibacterial peptide from bovine α S-casein. *International Dairy Journal*, 16(4), 316-323. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.05.005>
- Meisen, H., y Fitz Gerald, R.J. (2003). Biofunctional Peptides from Milk Proteins: Mineral Binding and Cytomodulatory Effects. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1289-1295. <https://doi.org/10.2174/1381612033454847>
- Mends, E. Rajapakse, N., y Kim, S.K. (2005). Antioxidant properties of radical-scavenging peptide purifies from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 581-587. <https://doi.org/10.1021/jf048877v>
- Mulero, C.J., Zafrilla, R.P. Martínez, C.A., Leal, H.M., Abellán, A.J. (2011). Bioactive peptides.
- Oberan, H., y Libudzisz, Z. (1998). Fermented milks. *Microbiology of fermented foods*, 308-350.
- Otles, S., & Cagindi, O. (2003). Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan journal of nutrition*, 2(2), 54-59.
- Prado M. R., Blandón, L. M., Vandenberghe, L.P., Rodríguez, C., Castro, G.R., Thomaz-Soccol, V., y Soccol, C.R. (2015). Milk kéfir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1177.
- Saygılı, D., Yerlikaya, O., & Akpınar, A. (2023). The effect of using different yeast species on the composition of carbohydrates and volatile aroma compounds in kefir drinks. *Food Bioscience*, 54, 102867. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102867>
- Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, 14, 111-125. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.043>

- Shi, M., Duan, X., Zheng, X., Lu, D., Ge, Y., Zhang, N., Liu, Y., You, J., Xue, H., y Yin, L. (2023). Quantification of human serum albumin by combining chymotrypsin/trypsin digestion coupled with LC-MS/MS technique. *Analytical Biochemistry*, 680(115316), 115316. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2023.115316>
- Shimizu, M., Sawashita, N., Morimatsu, F., Ichikawa, J., Taguchi, Y., Ijiri, Y., y Yamamoto, J. (2009). Antithrombotic papain-hydrolyzed peptides isolated from pork meat. *Thrombosis Research*, 123(5), 753-757 <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2008.07.005>
- Suetsuna, K., Ukeda, H., y Ochi, H. (2000). Isolation and characterization of free redical scavenging activities peptides derived from casein. *The Journal of National Biochemistry*, 11(3), 128-131. [https://doi.org/10.1016/s0955-2863\(99\)00083-2](https://doi.org/10.1016/s0955-2863(99)00083-2)
- Zeneboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A.M., & G da Cruz, A. (2020). Probiotic: conceptualization from a new approach. *Current Opinion in Food Science*, 32, 103-123. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.03.009>
- Zhang, Q., Yu, Z., & Zhao, W. (2023). Identification and action mechanism of novel antioxidative peptides from copra meal protein. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 188(115425), 115425. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115425>

3. ANÁLISIS FISICOQUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DE LECHE FERMENTADAS CON GRANOS DE KÉFIR

3.1 Resumen

Las leches fermentadas son alimentos funcionales que han demostrado contener bacterias acidolácticas (BAL) con potencial probiótico. Se colectaron cuatro granos de kéfir de diferentes productores del municipio de Zacatlán, denominados LFA, LFB, LFC y LFD. A las muestras se les realizaron análisis fisicoquímicos y microbiológicos. Se encontró que los contenidos de proteína, grasa, humedad y sólidos totales no tienen diferencias estadísticas significativas entre las muestras. Para los contenidos de proteína en las LFs tienen porcentajes de entre 4.10 y 4.52, para grasa los rangos variaron entre 2.61 y 2.77. Los sólidos totales estuvieron en un rango de entre 9.87 y 10.17. En relación a pH y acidez los parámetros fueron de 3.76 a 3.82 para pH y de 1.53 a 1.70 % de acidez. El análisis microbiológico en BAL se presentaron como mínimo $7.25 \log_{10} \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ de LF y como máximo $11.13 \log_{10} \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ y en levaduras como mínimo $6.05 \log_{10} \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ y $7.93 \log_{10} \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$. Por lo tanto, se concluye que las LFs inoculadas con granos de kéfir pueden ser consideradas como alimentos funcionales.

Palabras clave: Leche fermentada, kéfir, alimento funcional, probióticos

PHYSICOCHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF FERMENTED MILKS WITH KEFIR GRAINS

3.1 Summary

Fermented milks are functional foods that have been shown to contain lactic acid bacteria (LAB) with probiotic potential. Four kefir grains were collected from different producers in the municipality of Zacatlán, called LFA, LFB, LFC and LFD. The samples were subjected to physicochemical and microbiological analyses. It was found that the contents of protein, fat, moisture and total solids do not have significant statistical differences between the samples. For the protein contents in the LFs they have percentages between 4.10 and 4.52, for fat the ranges varied between 2.61 and 2.77. The total solids were in a range between 9.87 and 10.17. In relation to pH and acidity the parameters were from 3.76 to 3.82 for pH and from 1.53 to 1.70% acidity. The microbiological analysis in BAL presented a minimum $7.25 \log_{10} \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ of LF and a maximum $11.13 \log_{10} \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ and in yeast at least $6.05 \log_{10} \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $7.93 \log_{10} \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$. Therefore, it is concluded that LFs inoculated with kefir grains can be considered as functional foods.

Keywords: Fermented milk, kefir, functional food, probiotics

Thesis. Maestría en Ciencia, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.
Author: Karla Ortiz Trápala
Advisor: Dr. Consuelo S.O. Lobato Calleros.

3.2 Introducción

Las patologías gastrointestinales son un problema de salud a nivel mundial en diversos estratos sociales (Hernández et al., 2011). Elie Metchnikoff observó que los granjeros búlgaros vivían más tiempo y poseían más salud que la población en general, infería que esto era debido a su alto consumo de leche fermentada (Rajam y Subramnian, 2022), en 1908 propuso la primer definición de probiótico, sin embargo esta se ha modificado, discutido y extendido a lo largo de los años, y en la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) definieron a los probióticos como microorganismos vivos que se originan a partir de una matriz alimentaria y confieren un beneficio para la salud del huésped cuando se administran en cantidades adecuadas, ya sea en cepas únicas o combinadas (Ahn., Lee,G, Lee.W, 2023; Zendeboodi, Khorshidian, Mortazavian, y Da Cruz., 2020).

En la actualidad, se sabe que el consumo diario de microorganismos probióticos ayuda a mejorar y mantener la microbiota intestinal, y que esta misma contribuye a la prevención de diversas afecciones gastrointestinales (Rajam, y Subramnian, 2022). El kéfir es una bebida láctea casera obtenida por la fermentación de la leche con granos de kéfir, compuestos por una comunidad de bacterias ácido lácticas, levaduras y algunas bacterias del género *Acetobacter*, y debido a éstas comunidades de microorganismos algunos la consideran bebida probiótica (Bengoa et al., 2019; Rosa et al., 2017), es por ello que el objetivo de dicha investigación es conocer las características fisicoquímicas y la cuenta de microorganismos viables en cuatro muestras de LF con granos de kéfir provenientes de la ciudad de Zacatlán e impulsar su consumo en la población.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Ubicación del trabajo

El trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Tecnología de los Alimentos, ubicado en el Departamento de Preparatoria Agrícola y en el Laboratorio de Investigación localizado en el Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.3.2 Materiales

Las muestras de kéfir fueron colectadas en la ciudad de Zacatlán, Puebla, con coordenadas 19 ° 50' y 20° 06' de latitud norte; meridianos 7° 51' y 98° 11' de longitud oeste, altitud entre 900 y 2900 msnm.

3.3.3 Acondicionamiento de la muestra

Se pesaron 25 g de kéfir, se enjuagaron con agua destilada y se filtraron con un tamiz de plástico, posteriormente se inocularon con 250 mL de leche semidescremada Lala® y se incubaron a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) durante 48 h en recipientes de vidrio estériles, posterior a la fermentación los granos se filtraron y las muestras de leche fermentada se utilizaron para los análisis correspondientes (Garrote et al., 1997).

3.3.2 Análisis fisicoquímicos

Para el análisis de proteína, grasa, humedad y porcentaje de sólidos totales, se evaluaron con la técnica de transmisión de infrarrojo cercano con el analizador de lácteos FoodScan™ (Foss Analytical, CDMX, México) bajo la norma ISO 21543:2020; IDF, 201:2020. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

pH y acidez

La determinación de pH se realizó con un potenciómetro (Conductronic PC45, Puebla, México) se tomaron alícuotas por triplicado de cada muestra de leche fermentada (LF) y se realizaron las lecturas.

La acidez titulable (AT) se evaluó mediante titulación por neutralización con una solución estándar de NaOH 0.1 N y fenolftaleína como indicador; el porcentaje de ácido láctico se determinó con la ecuación 1, todas las mediciones se realizaron por triplicado (Cho et al., 2020).

$$\% \text{ Ácido Láctico} = \left(\frac{(10 * V_{NaOH} * 0.009 * 0.1)}{W} \right) 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde: V_{NaOH} es el volumen gastado de NaOH en la titulación

W es el peso de la muestra en gramos.

3.4 Análisis microbiológico

Se realizó la técnica de vaciado en placa según la metodología planteada por Azizi et al., (2017) y Falfán et al., (2022) con algunas modificaciones. Se suspendieron 25 mL de cada LF en 225 mL de agua peptonada 0.1 % (Sigma-Aldrich® Química, Toluca de Lerdo, México); y posteriormente se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-11} . La siembra para BAL fue de 10^{-9} , 10^{-10} y 10^{-11} en medio de cultivo MRS (Difco™ Laboratories, Detroit, Michigan, USA), mientras que para levaduras fueron 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-7} en medio de cultivo PDA (Bioxon, México City, México). El vaciado fue de la siguiente manera: se colocó 1 mL de cada dilución de interés en cajas de Petri desechables de 90 x 15 mm (Marca Sym, México) e inmediatamente se vertió el medio de cultivo correspondiente. Todas las siembras fueron realizadas por triplicado. Las BAL se incubaron en una estufa de cultivo (RossCha, México) durante 24 – 36 h a $37^{\circ}\text{C} \pm 2$ en condiciones anaeróbicas y se cuantificaron a los 3 d, mientras que las levaduras se incubaron a 27°C y se cuantificaron a los 5 – 7 d, bajo la norma NOM-111-SSA1-1994.

3.5 Análisis estadístico

Los resultados de los análisis fisicoquímicos y microbiológicos se sometieron a un Análisis de Varianza (ANOVA) con un Diseño completamente al azar (DCA). Se realizó una comparación de medias con la prueba de Tukey. El nivel de significancia se estableció en $p \leq 0.05$. Los datos se analizaron en los softwares SAS 9.4 (SAS Institute Inc.) y Minitab 17 (Minitab Inc. All rights reserved).

3.6 Resultados y discusión

3.6.1 Análisis fisicoquímicos

Los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica de las leches fermentadas (LF) se muestran en el Cuadro 1; el porcentaje de proteína presenta similitud con lo reportado por Kahraman-Ilikkan y Bagdat (2021) quienes en su investigación reportaron valores entre 4.8 y 5.8 % leche entera de vaca inoculado con granos de kéfir, mientras que en esta investigación los valores fueron 4.10 ± 0.17 y 4.52 ± 0.22 . Shalabi (2022) reportó porcentaje de proteína 4.96 ± 0.03 % en un yogur batido con melaza de algarroba al 15 % en el día cero de almacenamiento, posiblemente el porcentaje de proteína es superior al obtenido en este estudio debido a la adición de algarroba, en cuanto al contenido de grasa también reportó 2.78 ± 0.01 %, muy similar al obtenido en la LFD 2.77 ± 0.19 , igualmente Aidarbekova y Aider (2022) reportaron valores de 2.90 ± 0.01 en dos de sus tratamientos con suero electroactivado; por otro lado Cufaoglu y Erdinc (2023) y Vujicic et al. (1992) informaron que porcentajes de grasa del 1.2 % se deben a las ligeras reducciones en el contenido de grasa a causa de la producción de lipasa durante la fermentación.

La variable de sólidos totales (ST) no presentó diferencia estadística significativa en las cuatro leches fermentadas ($p \leq 0.05$) como se indica en el Cuadro 1. Estos resultados son muy similares a los reportados por Wszolek et al. (2001) en su estudio de leche bovina, caprina y ovina inoculadas con granos de kéfir obteniendo sólidos totales entre el 10.6 y 14.9 %.

En cuanto al contenido de humedad tampoco existió diferencia entre las LF donde los valores fueron 89.83 y 90.12 %, esto es congruente dado que el porcentaje de agua en leche cruda o ultrapasteurizada es del 87 % y para esta investigación únicamente se inocularon los granos de kéfir en leches semidescremadas, es decir no se alteró la materia prima, así mismo Liutkevicius y Sarkinas (2004) demostraron en su investigación que los granos de kéfir contienen 86.3 % mientras que la Academia Rusa de Ciencias Médicas menciona que el kéfir desgrasado y entero debe contener entre 88.9 y 91.4 % por lo tanto las muestras: LFA, LFB, LFC y LFD se ubican en el rango de dicha academia.

Se formaron dos grupos para la variable potencial hidrógeno (pH) en las cuatro leches fermentadas, en el primero se encuentran las LFD, LFA y LFC donde no existe diferencia estadística significativa entre ellas mientras que en el segundo grupo están LFA, LFC y LFB, otros autores como Maoloni et al. (2020) reportaron valores de pH que oscilaron entre 3.5 ± 0.3 y 4.3 ± 0.3 , sin embargo Pothuraju et al. (2018) y Yilmaz et al. (2022) indicaron un pH de 4.2 a 4.6 en la producción de kéfir artesanal con un tiempo de fermentación de 18 a 24 h, la diferencia con los resultados obtenidos en esta investigación comparado con los autores mencionados puede ser por el tiempo de fermentación. Rosa et al. (2017) y Ferreira (2010) aseveran que la lactosa es degradada durante la fermentación, lo que ocasiona una disminución del pH. Los porcentajes de ácido láctico fueron de 1.53 ± 0.022 % LFA a 1.70 ± 0.07 % LFD, Bosenea et al. (2017) reportaron valores de % AT de 1.1 % a 1.44% en yogur probiótico de *Lb. Casei* ATCC 393 a los 60 días de almacenamiento, esta diferencia puede deberse al tiempo de almacenamiento de las muestras y a los cultivos iniciadores.

Aproximadamente el 30 % de lactosa de la leche es hidrolizada por la enzima β -galactosidasa, la cual desdobla la lactosa en glucosa y galactosa, convirtiendo la leche fermentada a base de granos de kéfir como una opción viable para ser consumida por personas intolerantes a la lactosa.

Cuadro 1. Análisis fisicoquímico de cuatro LF.

Leche fermentada	Proteína (%)	Grasa (%)	ST (%)	Humedad (%)	pH
LFA	4.52 ± 0.22 ^a	2.61 ± 0.12 ^a	10.17 ± 0.18 ^a	89.83 ± 0.18 ^a	3.80 ± 0.010 ^{ab}
LFB	4.41 ± 0.20 ^a	2.69 ± 0.03 ^a	10.14 ± 0.10 ^a	89.86 ± 0.10 ^a	3.76 ± 0.005 ^b
LFC	4.41 ± 0.20 ^a	2.62 ± 0.16 ^a	9.87 ± 0.18 ^a	90.12 ± 0.18 ^a	3.79 ± 0.005 ^{ab}
LFD	4.10 ± 0.17 ^a	2.77 ± 0.19 ^a	9.92 ± 0.14 ^a	90.08 ± 0.14 ^a	3.82 ± 0.030 ^a

^{a,b} Medias ± Desviación estándar. Los valores con la misma letra en columnas son estadísticamente iguales ($p \leq 0.05$). ST=Solidos totales

3.6.2 Análisis microbiológico

La microbiota de los granos de kéfir y de la leche fermentada, contienen muchas especies de bacterias, levaduras y hongos los cuales forman una relación simbiótica compleja; las levaduras generan vitaminas, aminoácidos y otros compuestos que favorecen el crecimiento de las bacterias. De igual manera los metabolitos producidos por las bacterias son utilizados por las levaduras como fuente de energía (Rosa et al. 2017; Vardjan et al. 2013).

En el Cuadro 2 se presentan los logaritmos de unidades formadoras de colonias de BAL (entre 7 y 11 $\log_{10}$) y levaduras (6 y 8 $\log_{10}$) por mL de LF; Gamba et al. (2020) reportaron 10^8 y 10^9 UFC mL⁻¹ de BAL en leche de vaca fermentada con kéfir y en una bebida a base de soya, en cuanto a levaduras reportaron 10^4 y 10^7 UFC mL⁻¹, mientras que Irigoyen et al. (2020) obtuvieron cuentas de BAL de 10^8 UFC mL⁻¹ y 10^5 UFC mL⁻¹ en levaduras. De acuerdo con lo mencionado por la Federación Internacional de Lácteos (IDF), al momento de consumir el alimento éste debe contener al menos 10^6 UFC/mL de bacterias viables para considerarse como alimento funcional o probiótico, tal aseveración es secundada por Homayouni et al. (2008) y Rajam-Subramania (2022) quienes afirman que las leches fermentadas con granos de kéfir son probióticas.

Cuadro 2. Determinación cuantitativa de levaduras y BAL en cuatro leches fermentadas.

Leche fermentada	Levaduras (Log₁₀ UFC·mL⁻¹)	BAL (Log₁₀ UFC·mL⁻¹)
LFA	7.54 ± 0.07 ^b	7.83 ± 0.01 ^b
LFB	6.92 ± 0.20 ^c	11.13 ± 0.11 ^a
LFC	6.05 ± 0.05 ^d	11.10 ± 0.01 ^a
LFD	7.93 ± 0.00 ^a	7.25 ± 0.24 ^c

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).
UFC = Unidades Formadoras de colonias

3.7 Conclusiones

Las cuatro leches fermentadas evaluadas en este estudio aportan porcentajes significativos de proteína, bajo contenido en grasa y con pH bajo de 3.76 a 3.82 y valores de acidez de 1.53 ± 0.022 a 1.70 ± 0.07 %, característica propia de leches fermentadas con kéfir debido al crecimiento de BAL y a la producción de ácido láctico.

En este estudio se demostró que la LFB y LFC contienen al menos 11 logaritmos de BAL y 7 logaritmos de UFC mL⁻¹ de levaduras. Por lo tanto, se infiere que las leches fermentadas son una bebida funcional que puede ser consumida por personas intolerantes a la lactosa o con el síndrome de colon irritable.

Debido al consorcio de microorganismos presentes en los granos de kéfir que fermentan la leche, convierte a las LF como una buena alternativa para mantener una homeostasis intestinal saludable y contribuye a la economía de las familias mexicanas dado que es una bebida casera.

3.8 Agradecimientos

Al Departamento de Ingeniería Agroindustrial por facilitar los materiales requeridos en esta investigación, al CONAHCYT por la beca otorgada y al QFB. Adalberto Gómez Cruz por compartir su conocimiento.

3.9 Literatura citada

- Ahn, H., Lee, G., Lee, W., Kim, M., & Lee, K. G. (2023). Evaluation of probiotic and anti-inflammatory properties of bacteriocinogenic *Pediococcus acidilactici* HW01 and *Leuconostoc citreum* HW02 from malted barley. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 10(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s40538-023-00425-4>
- Aidarbekova, S., & Aider, M. (2022). Study of the physico-chemical, structural, microbiological properties and volatile flavour compounds profile of kéfir supplement with electro-activated whey. *International Dairy Journal* 126, 105218. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105218>
- Azizi, F., Habibi Najafi, M., & Edalatian Dovom, M.R. (2017). The biodiversity of *Lactobacillus* spp. From Iranian raw milk Motal cheese and antibacterial evaluation base don bacteriocin-encoding genes. *AMB Express* 7, 176. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0474-2>
- Bengoa, A.A, Iraporda, C., Garrote, G.L y Abraham, A.G. (2019). Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. *Journal of Applied Microbiology*, 126(3), 686-700 <https://doi.org/10.1111/jam.14107>
- Bosnea, L.A., Kopsahelis, N., Kokkali, V., Terpou, A., y Kanellaki, M. (2017). Production of a novel Probiotic yogurt by incorporation of *L. casei* enriched fresh Apple pieces, dried raisins and wheat grains. *Food and Bioprocess Technology*, 102, 62-71. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.11.010>
- Cho, W.-Y. Hwa, S.H., Yang, F., & Lee, C.H. (2020). Quality characteristics and antioxidant activity of yogury containing raw omija and sugared omija during storage. *Journal of Chemistry*, 2020, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2020/1274591>
- Cufaoglu, G., & Erdinic, A.N (2023). Comparative analyses of milk and wáter kéfir: Fermentation temperatura, physicochemical properties, sensory qualities, and metagenimic composition. *Food Bioscience*, 55(103079), 103079. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103079>
- Falfán, C.R.N., Mora, P.N., Gómez, A, C.A., Rangel, V.E., Acevedo, S.O.A., Franco, F.M.J., & Castro, R.J. (2022). Characterization and evaluation of the Probiotic potential in vitro and in situ of *Lactobacillus paracasei* isolated from tenate cheese. *Journal of Food Protection*, 85(1), 112-121. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-021>
- Faria, M. A., Pinho, O., Monteiro, D. P., Faria, S., Cruz, S. S., Perreira, A., Roque, A. C. A., & Tavares, P. (2010). Short communication: Effect of kefir grains on proteolysis of major milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 93(1), 27-31. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2501>

- Gamba, R.R., Yamamoto, S., Abdel-Hamid, M., Sasaki, T., Michihta, T., Koyanagi, T., & Enomoto, T. (2020). Chemical, Microbiological, and Functional Characterization of Kefir Produced from Cow's Milk and Soy Milk. *International Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1155/2020/7019286>
- Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M. R., Yarmand, M. S., & Razavi, S. H. (2008). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food chemistry*, 111(1), 50-55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.036>
- Illikkan, O.K., & Bagdaat, E.S. (2021). Comparison of bacterial and fungal biodiversity of Turkish kéfir grains with high-throughput metagenomic analysis. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 152, 112375. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112375>
- International Dairy Federation (2020). The International Dairy Federation, Milk
- International Standard ISO 21543 (2020). Milk products-Guidelines for the application of near infrared spectrometry. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/77606.html>. Revisado el día: 10/08/2023.
- Irigoyen, A. (2005). Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kéfir during storage. *Food Chemistry*, 90(4), 613-620. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.021>
- Litkevicius, A. & Sarkinas, A. (2004). Studies on the growth conditions and composition of kéfir grains. As a food and forage biomass. *Veterinaru ja in Zootechnika*, 25, 64-70.
- Moloni, A., Bliotta, G., Ferrocino, I., Mangia, N.P., Osimani, A., Milanovic V., ... y Aquilanti, L. (2020). Microbiological characterization of giorddu, an Italian fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*, 323, 108610. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108610>
- Pothuraju, R., Yenuganti, V. R., Hussain, S. A., & Sharma, M. (2018). Fermented milk in protection against inflammatory mechanisms in obesity. In S. Chatterjee., W. Jungraithmayr., y D. Bagchi (Eds.), *Immunity and Inflammation in Health and Disease* (pp. 389-401). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805417-8.00029-9>
- Raam, R., & Subramanian, P. (2022). Encapsulation of probiotics: past, present and future. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00228-w>
- Rsa, D.D., Dias, M.M.S., Grzeskowiak, L., Reis, S.A.D., Da Conceicao, L.L., & Pulúzio, M.D.C.G. (2017). Milk Kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition Research Reviews*, 30(1), 82-96. <https://doi.org/10.1017/S0954422416000275>

- Shalabi, O. M. (2022). Antioxidant, antibacterial, and antitumor activities of goat's stirred yoghurt fortified with carob molasses. *Annals of Agricultural Sciences*, 67(1), 119-126. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2022.06.003>
- Vardjan, T., Lorbeg, P.M., Rogelj, I., & Majhenic, A.C. (2013). Characterization and stability of lactobacilli and yeast microbiota in kéfir grains. *Journal of Dairy Science*, 96(5), 2729-2736. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5829>
- Vujicic, I.F., Vulic, M., & Konyves, T. (1992). Assimilation of cholesterol in milk by kéfir cultures. *Biotechnology Letters*, 14(9), 847-850. <https://doi.org/10.1007/bf01029151>
- Wszolek, M., Tamime, A.Y., Muir, D.D., & Barclay, M.N.I (2001). Properties of kéfir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. *LWT*, 34(4), 251-261 <https://doi.org/10.1006/fstl.2001.0773>
- Yilmaz, B., Shama, H., Melekoglu, E., & Özogul, F. (2022). Recent developments in dairy kéfir-derived lactic acid bacteria and their health benefits. *Food Bioscience*, 46, 101592. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101592>
- Zendeboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A.M., & G da Cruz, A. (2020). Probiotic: conceptualization from a new approach. *Current Opinion in Food Science*, 32, 103-123. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.03.009>

4. ANÁLISIS METAGENÓMICO SHOTGUN DE LECHES FERMENTADAS

4.1 Resumen

Se estudió la microbiota de dos bebidas lácteas (muestras A y D) fermentadas con granos de kéfir mediante un método independiente de cultivo y un enfoque metagenómico. Las muestras de ADN de cada leche fermentada se secuenciaron por metagenómica *shotgun* con Illumina HiSeq® (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA). Con lo cual se encontraron 77 géneros de microorganismos siendo los más representativos: *Acetobacter* (73.8%), *Lactobacillus* (19.6 %), *Lentilactobacillus* (3.9 %), *Lactococcus* (0.76 %). Así mismo, se identificaron ocho especies más abundantes en las dos leches fermentadas *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Acetobacter orientalis*, *Lactobacillus helveticus*, *Staphylococcus aureus*, *Acetobacter syzygii*, *Acetobacter okinawensis*, *Lentilactobacillus kefir* y *Lactococcus lactis*. A las 48 horas de fermentación con granos de kéfir, se produjeron nueve aminoácidos esenciales: histidina (His), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), metionina (Met), lisina (Lys), isoleucina (Ile), leucina (Leu), triptófano (Trp) y valina (Val) y dos no esenciales: arginina (Arg) y prolina (Pro).

Palabras clave: Leches fermentadas; kéfir; metagenómica.

Tesis de Maestría en Ciencia, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Karla Ortiz Trápala

Director de Tesis: Dra. Consuelo S.O. Lobato Calleros.

CHAPTER 4. SHOTGUN METAGENOMIC ANALYSIS OF FERMENTED MILKS

4.1 Summary

The microbiota of two dairy drinks (samples A and D) fermented with kefir grains was studied using an independent culture method and a metagenomic approach. DNA samples from each fermented milk were sequenced by shotgun metagenomics with Illumina HiSeq® (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). With which 77 genera of microorganisms were found being the most representative: *Acetobacter* (73.8%), *Lactobacillus* (19.6%), *Lentilactobacillus* (3.9%), *Lactococcus* (0.76%). Likewise, eight more abundant species were identified in the two fermented milks *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Acetobacter orientalis*, *Lactobacillus helveticus*, *Staphylococcus aureus*, *Acetobacter syzygii*, *Acetobacter okinawensis*, *Lentilactobacillus kefir* and *Lactococcus lactis*. After 48 hours of fermentation with kefir grains, nine essential amino acids were produced: histidine (His), tyrosine (Tyr), phenylalanine (Phe), methionine (Met), lysine (Lys), isoleucine (Ile), leucine (Leu), tryptophan (Trp) and valine (Val) and two non-essential ones: arginine (Arg) and proline (Pro).

Keywords: Fermented milks; kefir; metagenomics

Thesis. Maestría en Ciencia, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Karla Ortiz Trápala

Advisor: Dr. Consuelo S.O. Lobato Calleros.

4.2 Introducción

Los alimentos y bebidas fermentadas tradicionales han sido consumidos desde hace siglos, desarrollando un papel importante en el progreso de las civilizaciones, ya que forman parte de la identidad y cultura de las diferentes poblaciones humanas. No solo han sido empleadas en rituales y ceremonias, sino también han sido parte esencial en la alimentación dado que aportan beneficios nutricionales y promueven la salud del consumidor (Villarreal et al. 2018).

El consumo de alimentos fermentados ha aumentado en todo el mundo debido a los supuestos beneficios para la salud. Es fundamental comprender el microbioma de los alimentos fermentados que influye principalmente en la calidad y seguridad de estos alimentos. Uno de éstos alimentos es el kéfir, descrito como una bebida láctea fermentada cuya característica diferencial entre otras bebidas lácteas fermentadas son los granos de kéfir empleados como starter o cultivo iniciador, éstos están constituidos principalmente por el polisacárido kéfiran, el cual conforma una matriz polimérica con un consorcio de bacterias ácido lácticas (BAL), hongos y levaduras (Ebner et al., 2015; Turek y Wszolek 2022; Yegin et al., 2022; Wang, H., y Guo, M. 2023).

Anteriormente para conocer a detalle la composición microbiana de cualquier producto se realizaban técnicas dependientes de cultivo, sin embargo, ahora con el desarrollo de nuevas técnicas es posible conocer la diversidad microbiana de productos con técnicas independientes del cultivo. Se ha demostrado que la secuenciación metagenómica es una herramienta poderosa para describir la diversidad microbiana de diferentes matrices alimentarias, como quesos frescos, madurados, yogur probiótico, pulque, tepache y pozol por mencionar algunas (Kahraman-Ilıkkın, y Bağdat, 2021; Tenorio et al., 2021).

La metagenómica por shotgun es una herramienta tecnológica de secuenciación de alto rendimiento que combinada con enfoques computacionales ayudan a caracterizar y comprender las funciones específicas de las comunidades

bacterianas, así como a inferir rutas metabólicas importantes como por ejemplo la biosíntesis de aminoácidos (Quince et al., 2017).

Diversas investigaciones se han enfocado en el análisis metagenómico de los granos de kéfir, sin embargo, existen pocos estudios de la bebida fermentada con granos de kéfir, es necesario indagar sobre la composición microbiana y la presencia de comunidades procariotas y eucariotas, esto con la ayuda de las ciencias ómicas. Este estudio tuvo como objetivo elucidar la diversidad microbiana de las leches fermentadas con granos de kéfir a las 48 h de fermentación mediante la técnica independiente de cultivo: “secuenciación de alto rendimiento”.

4.3 Materiales y métodos

La extracción de ADN se efectuó en el Laboratorio de Biología Molecular, situado en el Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Capingo.

Para la extracción se empleó un kit ZymoBIOMICS® DNA Miniprep (Zymo Reserch, Irvine, EUA) y proteinasa K (Plasquim de México, México).

4.3.1 Extracción de ADN

La Extracción de ADN se realizó con el kit de minipreparación de ADN ZymoBIOMICSTM (Zymo Research, Irvine, California). La calidad del ADN extraído se analizó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE. EUA), la concentración mínima recomendada de ADN (10 ng/μl) y el nivel de pureza de densidad óptica a 260/280 (1.8-2.0 ng/μl), si la proporción es significativamente menor puede indicar la presencia de proteínas fenol u otros contaminantes que son detectados a 280 nm (Sambrook et al., 1989; Wilfinger, Mackey, K., y Chomczynski. 1997). Las muestras LFA y LFD alcanzaron la concentración mínima recomendada de pureza. El ADN extraído se almacenó en tubos de PCR y se mantuvo a - 20 °C hasta su secuenciación metagenómica *shotgun* con el servicio Shotgun

ZymoBIOMICS® para análisis de microbiomas (Zymo Research, Irvine, CA, EUA).

4.3.2 Secuenciación por Shotgun

Las muestras de ADN se procesaron con el servicio de secuenciación metagenómica para análisis de microbiomas Shotgun ZymoBIOMICS® (ZymoResearch, Irvine, CA), donde se prepararon las bibliotecas KAPA™ HyperPlus (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, EUA), la secuenciación se realizó con el sistema de secuenciación Illumina NovaSeq® (Illumina, San Diego, CA, EUA) y se cuantificaron las bibliotecas con TapeStation® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

4.3.3 Análisis bioinformático

El análisis bioinformático se realizó siguiendo la metodología descrita por Puentes, García y Tamames (2020). La cual se basa en el software SqueezeMeta para el procesamiento automatizado de lecturas sin procesar en contigs anotados y genomas reconstruidos (bins). Los datos fueron procesados en el cluster Topanzolco (<http://www.uusmb.unam.mx/>) perteneciente a la unidad universitaria de secuenciación masiva y bioinformática de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Las composiciones taxonómicas a nivel de género y especie se graficaron con el paquete ggplot 2 de RStudio v.4.2.3(Northern Ave, Boston, Ma, EUA).

KEGG

Para la reconstrucción de anotaciones funcionales de rutas metabólicas se utilizó el recurso bioinformático KEGG (Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto), el cual contiene una base de datos PATHWAY misma que está representada por aproximadamente 90 diagramas gráficos para rutas metabólicas como referencia.

Primero se identificaron los genes de enzimas del genoma con los marcos de lectura abiertos (ORFs), para ello se utilizó el software Prodigal (Hyatt et al., 2010) el cual se encargó de predecir genes codificadores de proteínas y determinó la referencia y similitud de secuencia con la correlación posicional de los genes y los números de clasificación numérica para las enzimas (CE), los cuales se asignaron y se construyeron computacionalmente rutas específicas del organismo correlacionando genes del genoma de estudio con productos génicos (enzimas) en las rutas de referencia de acuerdo con los números CE correspondientes (Kanehisa, M. 2000).

Se utilizó Kegg Mapper (<https://www.genome.jp/kegg/mapper/reconstruct.html>), como base de referencia para la construcción e interpretación biológica de secuencias genómicas y datos de alto rendimiento y la construcción de rutas metabólicas, se seleccionaron dos de las más representativas.

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Calidad de extracción de ADN

La calidad e integridad de la extracción de ADN de las cuatro leches fermentadas se muestran en el Cuadro 3. De acuerdo con Requena y Pauca (2023) se obtuvieron rangos aceptables en cuanto al rango de pureza (A 260/280) 1.7- 2.0.

Cuadro 3. Calidad e integridad de extracción de ADN de LFs

Muestra	ng / μ L	260/280
LFA	57.3	1.70
LFB	48.9	1.74
LFC	42.2	1.70
LFD	64.9	1.73

LFA = Leche fermentada productor A. LFB = Leche fermentada productor B, LFC = Leche fermentada productor C, LFD = Leche fermentada productor D. Fuente: Elaboración propia con datos experimentales.

4.4.2 Abundancia relativa

Género

Las leches que fueron fermentadas con el cultivo iniciador (granos de kéfir) de los productores A y D presentaron una comunidad de 77 géneros y se seleccionaron los cinco con mayor abundancia (Figura 1). El género con mayor presencia en las dos leches fermentadas es *Acetobacter* con ~ 70 %. El segundo género más representativo es *Lactobacillus*, seguido de *Lentilactobacillus* y *Lactococcus*, sin embargo, el género *Staphylococcus* presentó mayor abundancia en la leche fermentada D. Walsh et al. (2016) evaluaron tres variedades de granos de kéfir; en los cuales evidenciaron la presencia de *Acetobacter*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium* y *Bifidobacterium* como géneros bacterianos dominantes, en cuanto a géneros de hongos únicamente detectaron la presencia de *Saccharomices* y *Kazachstania*. Mientras que Wang y Guo (2023) reportaron un total de 20 géneros representativos y 12 dominantes de los cuales dos coinciden con los encontrados en esta investigación; *Lactobacillus*, y *Acetobacter*; esta pequeña variación en los resultados puede deberse a que Wang y Guo emplearon granos de kéfir reconstituidos, es decir fueron sometidos a un tratamiento de deshidratación y posteriormente se reintegraron con leche de cabra. Bengoa et al. (2019) afirmó que la diversidad de microorganismos en los granos de kéfir y en la bebida fermentada cambia de acuerdo al tipo de leche, temperatura de fermentación, origen de los granos y las condiciones de procesamiento.

Por otro lado, You et al. (2022) en su estudio comparativo de 73 leches fermentadas; encontraron mayor abundancia de *Leuconostoc*, *Acetobacter*, *Lactobacillus* y *Lentilactobacillus* en 18 muestras de que el kéfir, igualmente mencionaron que las bacterias miembros de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Acetobacter* son comúnmente asociadas a lácteos y éstas desempeñan un papel importante en la fermentación de la leche.

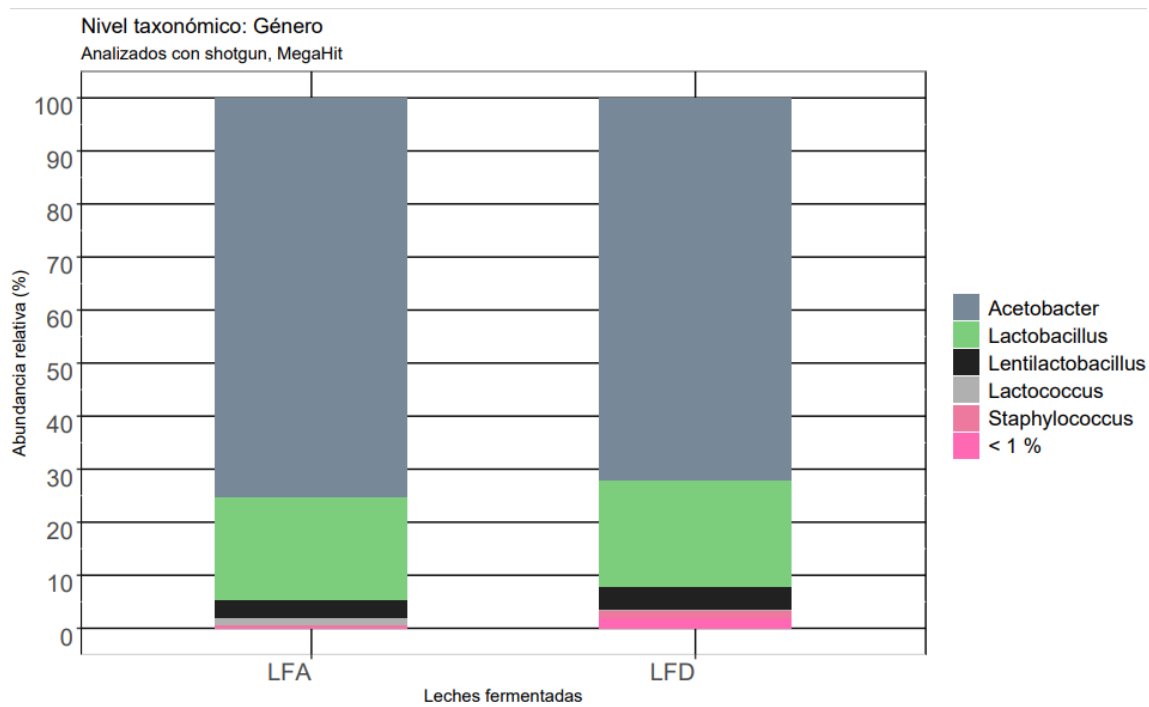


Figura 1. Principales Géneros presentes en LFA y LFD.

LFA = Leche fermentada productor A. LFD = Leche fermentada productor D

Especie

Las LFA y LFD presentaron una comunidad de 77 especies (Figura 2). La especie con mayor presencia en la leche **fermentada A** es *Lactobacillus Kefiranofaciens*, seguido de *Acetobacter orientalis*, *Staphylococcus aureus* y *Lactobacillus helveticus*. Mientras que la leche **fermentada D** presentó mayor presencia de *Acetobacter orientalis*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus helveticus* y *Staphylococcus aureus*. Wang y Guo (2023) en su investigación de leche de cabra fermentada con granos de kéfir reconstituidos identificaron 41 especies bacterianas y dentro de las diez más representativas al igual que en este estudio encontraron *L. kefiranofaciens*, y *L. helveticus*. Mientras que Walsh et al. (2023) reportaron que en 215 muestras de kéfir las especies con mayor presencia fueron *Lc. lactis*, *L. helveticus*, *L. kefiranofaciens*, *Acetobacter orientalis* y *Leuconosoc mesenteroides*, igualmente mencionaron que no hubo diferencias importantes en cuanto la dominancia respecto al tiempo de fermentación (8 y 24 h). Por otro lado, Zeng et al. (2022) identificaron un total de 715 especies en tres variedades de

granos de kéfir tibetano donde la cepa dominante fue *Lactobacillus kefiranofaciens*, *L. crispatus*, *L. oris*, *L. mali* y *L. hilgardii*. De acuerdo con lo reportado con los autores anteriormente mencionados se observó que los granos de kéfir *L. kefiranofaciens* y *Acetobacter orientalis* en leches fermentadas.

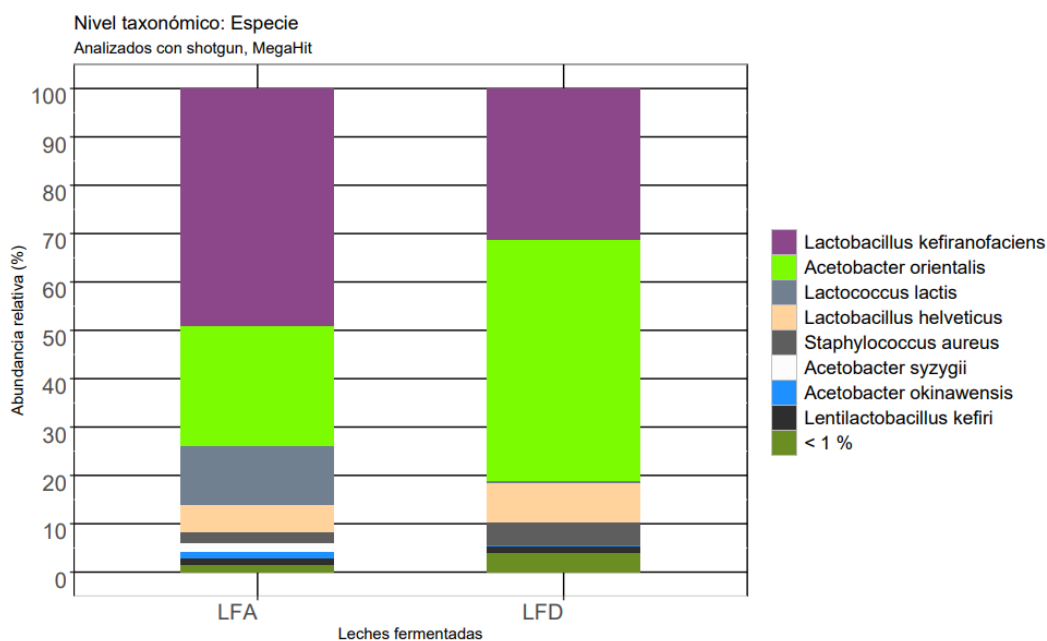


Figura 2. Principales Especies presentes en LFA y LFD.

LFA = Leche fermentada productor A. LFD = Leche fermentada productor D

4.4.3 Reconstrucción de rutas metabólicas (KEGG)

El recurso de datos KEEG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, por sus siglas en inglés) es una base de referencia para la interpretación biológica de conjuntos de datos moleculares, el cual genera un diagrama gráfico dibujado manualmente donde se muestran redes de señalización, metabólicas y de reacción-interacción molecular. La base de datos PATHWAY contiene mapas de vías para el procesamiento de información genética, metabolismo, procesos celulares ambientales, procesamiento de información y enfermedades humanas, por mencionar algunos (Kanehisa y Sato, 2020; Zeng et al. 2022)

En la Figura 3 se muestran las rutas metabólicas de la biosíntesis de aminoácidos de leches fermentadas A y D. Para rastrear la ruta de la muestra A se identificó con línea verde, mientras que para la leche fermentada D, fue el color rojo, si las dos muestras presentaron la misma ruta metabólica, la línea de señalización fue en color azul.

La leche fermentada A y D presentaron aminoácidos esenciales como la histidina (His), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), metionina (Met), lisina (Lys), isoleucina (Ile), leucina (Leu), triptófano (Trp) y valina (Val), estos resultados son similares a los reportados por Hameed et al. (2021) quienes realizaron inoculaciones de *Lactobacillus plantarum* Bu-Eg5 y *Lactobacillus rhamnosus* Bu-Eg6 en leches descremadas que también reportaron nueve aminoácidos esenciales, mientras que en esa misma investigación reportaron ocho aa no esenciales y en esta investigación únicamente se localizaron dos: arginina (Arg) y prolina (Pro).

Las bacterias ácido lácticas trabajan en conjunto con las levaduras, estas disminuyen el pH y facilitan la liberación de péptidos bioactivos que proveen aa para el crecimiento de otras bacterias como las del género *Acetobacter* (Ponomarova et al., 2017). En las leches fermentadas, se encontraron bacterias homofermentativas como *Lactococcus lactis*, *Lactococcus helveticus*, *Lactobacillus kefiranofaciens* y heterofermentativas como *Acetobacter orientalis*, *Acetobacter syzygii* y *Acetobacter okinawensis*. Algunos aminoácidos esenciales, como la L-tirosina, la L-fenilalanina y la L-isoleucina, son clave que se producen de forma significativa durante la fermentación, mismos que se encontraron en las muestras de esta investigación. En la figura 4 se muestra la biosíntesis de los aminoácidos esenciales y no esenciales, de los cuales la His, Try y Phe provienen de la ruta de las pentosas después de la fermentación de 48 h, mientras que Cui et al. (2023) mencionan que a las 36 h se descompone significativamente la caseína y por lo tanto la expresión de los polipéptidos Tyr Leu Trp, Pro, Phe, Val Ile Ser Leu, Ala Phe Leu e Ile Thr aumenta.

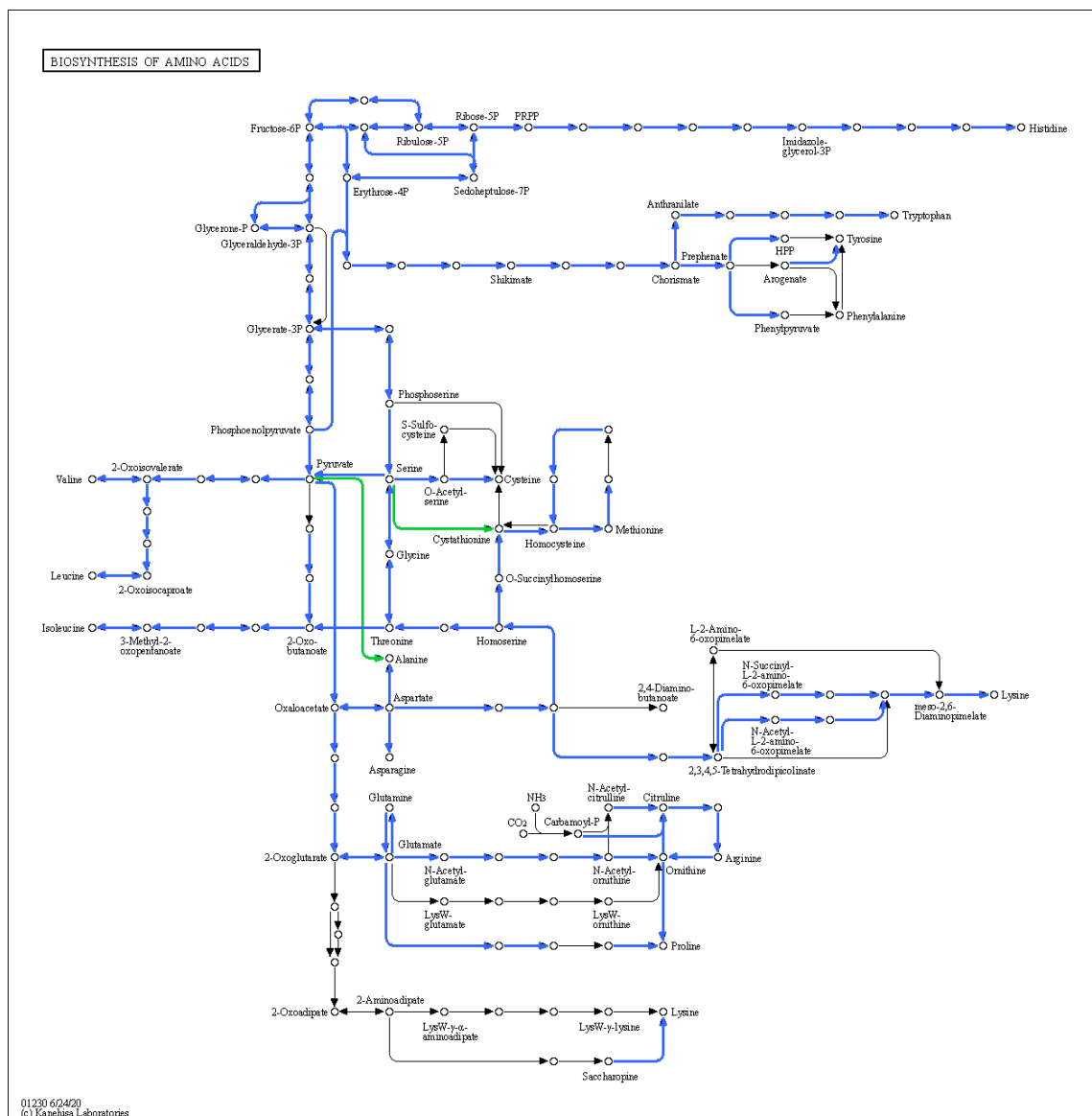


Figura 3. Ruta metabólica de principales aminoácidos en leches fermentadas A y D, a través de la plataforma KEGG mapper (<https://www.genome.jp/kegg/mapper/reconstruct.html>)

En la Figura 4 se observa la ruta metabólica de la riboflavina que a su vez muestra el EC (Enzyme Commission numbers), las enzimas señaladas con color rosa se localizaron en LFA, mientras que las de color verde corresponden a LFD. Papagianni (2012) en su investigación sobre ingeniería metabólica de bacterias acidolácticas para la producción de compuestos de importancia industrial, afirmó que la cepa de *L. lactis* fabrica riboflavina mediante la sobreexpresión de genes

biosintéticos de riboflavina. En esta investigación igualmente se encontró presencia de *L. lactis* en la LFA y D, lo cual justifica la expresión de dicha ruta metabólica, así mismo, la riboflavina es uno de los micronutrientes esenciales para el cuerpo humano con una amplia gama de funciones fisiológicas, por lo tanto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la ha catalogado como uno de los seis indicadores para evaluar el crecimiento, el desarrollo y el estado nutricional del hombre (J. Zhang et al., 2022). La riboflavina también conocida como B2 se encontró en las leches fermentadas A y D, y su ruta de origen es la ruta de las pentosas, por lo tanto, es imprescindible el consumo de leches fermentadas en la alimentación de la población dado que respecto a esta investigación presenta cualidades funcionales, como la proporción de vitaminas del complejo B.

Figura 4. Ruta metabólica de (riboflavina), a través de la plataforma KEGG mapper (<https://www.genome.jp/kegg/mapper/reconstruct.html>)

4.5 Conclusiones

La secuenciación de alto rendimiento brindó información eficaz acerca de la comunidad microbiana de las leches fermentadas LFA y LFD con granos de kéfir, demostrando que la secuenciación profunda puede ser empleada para comprender mejor el papel que desarrollan los microorganismos en los productos lácteos fermentados.

En este estudio se demostró que las LFA y LFD contienen 77 géneros y especies de los cuales únicamente se mostraron cuatro principales géneros y ocho especies, lo cual convierte a la leche fermentada con granos de kéfir en una bebida probiótica y funcional favorable para el consumo humano.

4.6 Agradecimientos

Al laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia ubicado en la Universidad Autónoma Chapingo.

A la Unidad Universitaria de Secuenciación masiva y bioinformática, especialmente a la Dra. Leticia Vega Alvarado

4.7 Literatura citada

- Bengoa, A. A., Iraporda, C., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2018). Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. *Journal of Applied Microbiology*, 126(3), 686-700. <https://doi.org/10.1111/jam.14107>
- Cui, Y., Wang, X., Yue, Y., Du, G., Chen, H., Ning, M., Yuan, Y., & Yue, T. (2023). Metagenomic features of tibetan kefir grains and its metabolomics analysis during fermentation. *LWT*, 175, 114502. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114502>
- Ebner, J., Arslan, A. A., Fedorova, M., Hoffmann, R., Küçükçetin, A., & Pischetsrieder, M. (2015). Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or kefir grains. *Journal of Proteomics*, 117, 41-57. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.01.005>
- Hameed, A. M., Elkhtab, E., Mostafa, M., Refaey, M., Hassan, M. A., El-Naga, M. Y. A., ... & Aly, A. A. (2021). Amino acids, solubility, bulk density and water

- holding capacity of novel Freeze-Dried cow's skimmed milk fermented with potential probiotic *Lactobacillus plantarum* BU-EG5 and *Lactobacillus rhamnosus* BU-EG6. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(8), 103291. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103291>
- Hyatt, D. R., Chen, G. L., LoCascio, P. F., Land, M., Larimer, F. W., & Hauser, L. (2010). Prodigal: Prokaryotic Gene Recognition and Translation Initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119>
- Kahraman-Ilıkkın, Ö., & Bağdat, E. Ş. (2021). Comparison of bacterial and fungal biodiversity of Turkish kefir grains with high-throughput metagenomic analysis. *LWT*, 152, 112375. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112375>
- Kanehisa, M. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kanehisa, M., & Sato, Y. (2019). KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences. *Protein Science*, 29(1), 28-35. <https://doi.org/10.1002/pro.3711>
- Ponomarova, O., Gabrielli, N., Sévin, D. C., Müllender, M., Zirngibl, K., Bulyha, K., Andrejev, S., Kafkia, E., Typas, A., Sauer, U., Ralser, M., & Patil, K. R. (2017). Yeast creates a niche for symbiotic lactic acid bacteria through nitrogen overflow. *Cell Systems*, 5(4), 345-357.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.09.002>
- Papagianni, M. (2012). Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 3(4), e201210003. <https://doi.org/10.5936/csbj.201210003>
- Posit Team (2023) RStudio: Integrated development environment for R. Posit Software, PBC, Boston, MA. URL <http://www.posit.co/>
- Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun Metagenomics, From sampling to analysis. *Nature Biotechnology*, 35(9), 833-844. <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>
- Requena, A., & Chanca, R. P. (2023). Comparación de dos métodos de extracción de adn en parásitos (*Sarcoptes scabiei*) de alpacas huacaya de la provincia de huancavelica. *Revista Peruana de Ciencia Animal*, 1(1), 6-12.
- Sanbrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory*, 11, 31.
- Tenorio-Salgado, S., Castelán-Sánchez, H. G., Dávila-Ramos, S., Huerta-Saquero, A., Rodríguez-Morales, S., Merino, E., Roa, L. F., Solís-Pereira, S., Pérez-Rueda, E., & Lizama-Uc, G. (2021). Metagenomic analysis and

- antimicrobial activity of two fermented milk kefir samples. *MicrobiologyOpen*, 10(2). <https://doi.org/10.1002/mbo3.1183>
- Turek, K., & Wszolek, M. (2022). Effect of walnut oil on the fatty acid content of probiotic kefir produced either with kefir grains or kefir starter cultures. *International Dairy Journal*, 127, 105290. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105290>
- Villarreal-Morales, S., Montañez, J., Aguilar, C. N., & Rodríguez-Herrera, R. (2018). Metagenomics of traditional beverages. A.M. Holban y A.G. Mihai (Eds.) In *Elsevier eBooks* (pp. 301-326). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811443-8.00011-6>
- Walsh, A. M., Crispie, F., Kilcawley, K. N., O'Sullivan, Ó., O'Sullivan, M. G., Claesson, M. J., & Cotter, P. D. (2016). Microbial succession and flavor production in the fermented dairy beverage kefir. *MSystems*, 1(5). <https://doi.org/10.1128/msystems.00052-16>
- Wang, H., & Guo, M. (2023). Microbiological profiles, physiochemical properties and volatile compounds of goat milk kefir fermented by reconstituted kefir grains. *LWT*, 183, 114943. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114943>
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczyński, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22(3), 474-481. <https://doi.org/10.2144/97223st01>
- Yeğin, Z., Yurt, M. N. Z., Taşbaşı, B. B., Acar, E. E., Altunbaş, O., Uçak, S., Özalp, V. C., & Sudağıdan, M. (2022). Determination of bacterial community structure of Turkish kefir beverages via metagenomic approach. *International Dairy Journal*, 129, 105337. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105337>
- You, L., Yang, C., Jin, H., Kwok, L., Sun, Z., & Zhang, H. (2022). Metagenomic features of traditional fermented milk products. *LWT*, 155, 112945. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112945>
- Zeng, X., Wang, Y., Jia, H., Wang, Z., Gao, Z., Luo, Y., Sheng, Q., Yuan, Y., & Yue, T. (2022). Metagenomic analysis of microflora structure and functional capacity in probiotic tibetan kefir grains. *Food Research International*, 151, 110849. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110849>

5. SECUENCIACIÓN DE PÉPTIDOS EN LECHE FERMENTADAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC-MS/MS)

5.1 Resumen

En el kéfir se encuentran microorganismos vivos, tales como las bacterias ácido lácticas (BAL) las cuales son consideradas como microorganismos probióticos, ya que muchas de ellas muestran actividad proteolítica hacia las proteínas de la leche, lo que ocasiona la liberación de péptidos bioactivos. Los péptidos bioactivos son fragmentos de proteínas específicos que tienen un impacto positivo en una función o condición corporal y pueden influir benéficamente en el organismo. En este estudio se realizó la identificación de péptidos bioactivos de cuatro leches fermentadas (LFA, LFB, LFC y LFD) inoculadas con cuatro granos de kéfir de cuatro diferentes productores de la ciudad de Zacatlán, LFA, LFB, LFC y LFD mediante la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), con la cual se identificaron 33 proteínas y 3691 péptidos con actividad biológica. Las principales actividades biológicas que se encontraron *in silico* fueron: antiinflamatoria inhibidora de ACE, antibacterial, inhibidor de DPP – III y DPP – IV, antitrombótico, anticancerígeno y antioxidante. Se evaluó la actividad antioxidante *in vitro* con los ensayos ABTS y DPPH; las muestras LFA (47.50 ± 0.70 %) y LFD (47 ± 0.01) mostraron mayor porcentaje de actividad inhibidora para el radical ABTS respecto a las otras muestras, mientras que para DPPH la muestra LFB demostró porcentaje de inhibición de 55.45 ± 0.07 % ($p \leq 0.05$).

Palabras clave: Leche fermentada; Péptidos bioactivos; Antioxidante.

Tesis de Maestría en Ciencia, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Karla Ortiz Trápala

Director de Tesis: Dra. Consuelo S.O. Lobato Calleros.

PEPTIDE SEQUENCING IN FERMENTED MILKS BY MASS SPECTROMETRY (LC-MS/MS)

5.1 Summary

In kefir there are live microorganisms, such as lactic acid bacteria (LAC) which are considered probiotic microorganisms, since many of them show proteolytic activity towards milk proteins, which causes the release of bioactive peptides. Bioactive peptides are specific protein fragments that have a positive impact on a bodily function or condition and can beneficially influence the organism. In this study, the identification of bioactive peptides of four fermented milk samples LFA, LFB, LFC and LFD was performed using the liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) technique, with which 33 proteins and 3691 peptides with biological activity were identified. The main biological activities that were found *in silico* were: ACE inhibitory anti-inflammatory, antibacterial, DPP–III and DPP–IV inhibitor, antithrombotic, anticancer and antioxidant. The antioxidant activity was evaluated *in vitro* with the ABTS and DPPH assays; being the LFA ($47.50 \pm 0.70\%$) and LFD (47 ± 0.01) with the highest percentage of “inhibitory activity” for the ABTS radical, while for DPPH it was $55.45 \pm 0.07\%$ ($p \leq 0.05$) in LFB.

Palabras clave: Fermented milk; Bioactive peptides; Antioxidant.

Thesis.Maestria en Ciencia, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria,
Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Karla Ortiz Trápala

Advisor: Dr. Consuelo S.O. Lobato Calleros.

5.2 Introducción

A partir del desarrollo de la medicina moderna la humanidad ha consumido medicamentos para tratar, mitigar o prevenir enfermedades crónicas o agudas. Sin embargo, con el progreso de la ciencia y el estudio de los alimentos su composición química, funcional y los efectos benéficos que generan en el ser humano ha aumentado la popularidad de consumo de alimentos funcionales y nutracéuticos (Abdel et al., 2019). Los productos lácteos fermentados son considerados como los primeros alimentos funcionales; estos alimentos se definen como aquellos que promueven la salud más allá de proporcionar una nutrición básica (Sanders, 1998). Algunos de estos alimentos son el kéfir y el yogur, ya que poseen características únicas; el kéfir es una leche fermentada probiótica originaria de las montañas del norte del Cáucaso y se tiene registro de que se ha consumido desde el año 2000 a.C., su nombre proviene del eslavo Keif, que significa bienestar debido a los efectos benéficos asociados con su consumo; el yogur es otra bebida probiótica que muestra la presencia de bacterias ácido lácticas, que tienen sistemas proteolíticos que les permiten tener un buen desarrollo en la leche y liberar péptidos potencialmente bioactivos (Sah et al., 2014).

Los péptidos funcionales o bioactivos se definen como secuencias de aminoácidos inactivos ubicados en el interior de la proteína, los cuales exhiben una actividad biológica definida después de su liberación mediante hidrólisis enzimática a causa de enzimas digestivas (Kilara y Panyam, 2003), sin embargo igualmente se liberan péptidos durante la fermentación de la leche que contiene cultivos iniciadores ya que las enzimas derivadas de microorganismos llevan a cabo procesos proteolíticos (Fuglsang et al., 2003; Yamamoto, Akino y Takano, 1994). Regularmente suelen ser péptidos pequeños de 3 a 20 aminoácidos, en algunos casos pueden contener más aminoácidos, que son liberados durante el procesamiento industrial de los alimentos o durante la digestión gastrointestinal (Mulero et al., 2011).

Las enfermedades crónicas y los fenómenos de envejecimiento son relevantes para el desequilibrio de los niveles de radicales libres en el cuerpo, si se tiene un exceso de radicales libres esto puede generar daño celular letal al oxidar proteínas celulares, enzimas, lípidos de membrana y ADN; y cuando el daño no se puede reparar, pueden surgir enfermedades crónicas como el cáncer, diabetes y enfermedades cardiovasculares. Por lo cual es indispensable inhibir la peroxidación de los lípidos y la generación y propagación de radicales libres en las células vivas y en los alimentos. Los antioxidantes de origen natural son una excelente alternativa para evitar la generación de radicales libres, ya que los antioxidantes poseen propiedades quimioterapéuticas y de conservación (Sah et al. 2014; Urso et al. 2003). Por lo anterior en la presente investigación se evaluó la actividad antioxidante *in vitro* y las posibles actividades biológicas *in silico* de cuatro leches fermentadas con granos de Kefir.

5.3 Materiales y métodos

El procesamiento de las muestras para la obtención de extractos solubles se realizó en el Laboratorio de Tecnología de los Alimentos, ubicado en el Departamento De Preparatoria Agrícola; la digestión y secuenciación de proteínas se llevó a cabo en el Laboratorio Universitario de Proteómica (LUP) ubicado en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBt. UNAM).

Los reactivos utilizados albumina bovina (BSA), Folin-Ciocalteu, dodecilsulfato de sodio (SDS), persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$), ácido clorhídrico (HCl, hidróxido de sodio (NaOH), dithiothreitol, iodoacetamida fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, U.S.A). La enzima tripsina fue adquirida de Promega Sequencing (PROMEGA Madison, Wisconsin EUA).

5.3.1 Obtención de extractos peptídicos solubles en agua

Los extractos peptídicos solubles se obtuvieron siguiendo la metodología descrita por Sah et al., (2014) y Yang et al., (2021). Se tomaron 100 mL de cada LF se ajustó pH a 4.6 con HCL 1 M adicionando NaOH 6M, posteriormente las muestras se centrifugaron a (8000 rpm) a 4 ± 1 °C por 15 min en una Centrifuge 5810 R (Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania), se retiró el sobrenadante y se filtraron con papel Watman™ No. 41 enseguida se realizó un segundo filtrado con un filtro de jeringa con membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) con tamaño de poro de 0.45 (Minisart SRP 4®, Sartorius, Gottingen, Alemania), las fracciones filtradas se almacenaron a -20 °C para análisis posteriores (Mahmoud et al., 2019).

5.3.2 Determinación de proteína soluble por el método de Lowry

Se estimó el contenido de proteína soluble por el método de Lowry et al. (1951); se tomó 1 mL de las fracciones de LF obtenidas y se colocaron en tubos de ensayo, posteriormente se agregó 1 mL de solución conformada por una mezcla en partes iguales de las siguientes disoluciones: 1) carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 10 % (m/v), sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) al 0.1 % (m/v) y tartrato de sodio y potasio ($\text{KOCO}(\text{CHOH})_2\text{COONa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 0.2 % (m/v), 2) hidróxido de sodio NaOH 0.8 N y 3) dodecilsulfato de sodio (SDS) 10 % (m/v), se dejó en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente (21 ± 1 °C) bajo protección luminosa. Posteriormente se agregaron 0.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu 0.3 N y se dejó en reposo durante 30 min a temperatura ambiente bajo protección luminosa. Finalmente, se midió la absorbancia a 750 nm con un espectrofotómetro Genesys 10s UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) los valores obtenidos fueron interpolados con un modelo obtenido a partir de una curva estándar de BSA ($0 - 0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$).

5.3.3 Determinación de actividad antioxidante

DPPH

El ensayo DPPH se determinó por la capacidad de inhibición del radical libre DPPH (2,2 difenil-1picrilhidrazil) (Sigma-Aldrich México, Toluca, Estado de México, México) de acuerdo con lo descrito por de Lima et al., (2018) con algunas modificaciones; los ensayos se realizaron mezclando 1.5 mL de la disolución del radical DPPH 0.00008 M en metanol 80 % (v/v) y 0.5 mL de muestra LFA, LFB, LFC, LFD (0.85 mg de proteína mL⁻¹). Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente (21 ± 1 °C) bajo protección luminosa. Transcurrido el tiempo de reacción se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Genesys 10S-UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A) a 515 nm. Se preparó un blanco con 1.5 mL de metanol al 80 % (v/v) y un control con 1.5 mL de solución DPPH 0.08 mM y 0.5 mL de metanol al 80 %. El porcentaje de inhibición del radical se calculó mediante la ecuación 2:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{Abs_{DPPH} - Abs_{muestra}}{Abs_{DPPH}} * 100 \quad (\text{Ec 2})$$

Donde: Abs_{DPPH} es la absorbancia del ensayo sin adición de la muestra

$Abs_{muestra}$ es la absorbancia del ensayo con la muestra adicionada.

ABTS

El ensayo ABTS se adaptó de Re et al. (1999) y Abdel-Hmid et al. (2019), se realizó la determinación de actividad antioxidante por medio de la capacidad de inhibición del radical libre ABTS (2,2'azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6sulfónico)); se preparó la solución madre de ABTS diluyendo 0.0406 g de ABTS 0.0074 M en 5 mL de agua destilada, homogeneizaron bien y aforaron a 10 mL y 0.0175 g de persulfato de potasio 0.0025 M (concentración final), se almacenó bajo protección luminosa a temperatura ambiente (21 ± 1 °C) durante 16 h. La solución madre de ABTS se diluyó con agua destilada para obtener una absorbancia de 0.7000 ± 0.002 a 734 nm. Para los ensayos, se mezclaron 750 µl de la disolución

del radical ABTS con 250 µl de muestra a 8.5 mg de proteína mL⁻¹. Se incubó por 6 min a temperatura ambiente (21 ± 1 °C). Concluida la reacción se midió la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) utilizando etanol como blanco. El porcentaje de inhibición del radical se calculó mediante la ecuación 3.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{Abs_{ABTS} - Abs_{muestra}}{Abs_{ABTS}} * 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde: Abs_{ABTS} es la absorbancia del ensayo sin adición de la muestra

$Abs_{muestra}$ es la absorbancia del ensayo con la muestra adicionada.

5.3.4 Separación de proteínas por peso molecular (SDS-PAGE)

Se realizó electroforesis desnaturalizante de acuerdo con Laemmli (1970), con gel de separación de poliacrilamida SDS-PAGE 12 %. Se mezclaron 5 µl de cada muestra (8.5 mg · mL⁻¹), con 5 µl de solución amortiguadora (Tris-HCL 0.125 M pH 6.8, SDS 4 % (m/v), glicerol 25 mL L⁻¹, 2- β-mercaptoetanol 10 mL L⁻¹ y azul de bromofenol 0.20 g L⁻¹) se hirvieron durante 5 minutos a 94 °C. En el primer pozo del gel se colocaron 10 µl marcador de peso molecular (10 – 245 kDa) y en los siguientes cuatro pozos se inyectaron 10 µl de cada muestra LFA, LFB, LFC, LFD respectivamente. Posteriormente el gel se sumergió en solución fijadora (IPA 25 % y HOPO 10%) por 60 min, se retiró la solución fijadora y se añadió solución de tinción (azul de comassie 60 mg en 10 % ácido acético) permaneció en agitación suave durante toda la noche, finalmente se retiró la solución y se enjuagó el gel cuatro veces con agua MiliQ.

5.3.5 Digestión de proteínas en gel

La digestión de proteínas se realizó mediante la metodología descrita por Havilis et al. (2023) y Sun et al. (2006) con algunas modificaciones. Se cortaron las bandas y posteriormente se hizo una reducción de las proteínas con DTT 50 mM a 56 °C por 30 minutos, enseguida se realizó una alquilación de las proteínas con yodo acetamida (IAA) 10 Mm, las muestras se mantuvieron a temperatura

ambiente durante 30 minutos y se cubrieron de la luz directa, posteriormente se utilizó Tripsina de Promega (Madison, WI) para la escisión proteolítica y la digestión se realizó con tampón bicarbonato de amonio (ABC) 25 mM, (pH 8.2) a 37 °C durante la noche. Finalmente se realizó un desalado de los péptidos empleando puntas ZipTip C18Sep-Park de Walters (Milford, MA). Las muestras se secaron en un SpeedVac-Savant SPD 1010 de ThermoScientific para concentrar las proteínas y diluirlas en ácido fórmico al 0.1 % y proceder a la inyección al espectro de masas Thermo Scientific Orbitrap Velos Pro (Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved)

5.3.6 Secuenciación de péptidos mediante (LC-MS/MS)

Para el análisis de espectrometría de masas se siguió la metodología descrita por Rodríguez et al. (2015) con algunas modificaciones; las muestras LFA, LFB, LFC y LFD se analizaron individualmente mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem por electropulverización LC-MS/MS. Se inyectaron 50 µg de cada muestra en el equipo. Se empleó una columna capilar C18 empaquetada internamente a un espectrómetro de masas Orbitrap de Thermo Scientific (San José, CA). En fase móvil A se utilizó ácido fórmico al 0.1 % en agua y en la fase móvil B ácido fórmico al 0.1 % en acetonitrilo. Se aplicó un caudal de 400 nL/min. Posterior al equilibrio de la columna en el segundo disolvente B al 5%, se inyectó una alícuota de cada muestra total (50 µg de proteína), luego el contenido orgánico de la fase móvil se aumentó linealmente hasta el 60 % durante 150 minutos y luego al 70 % durante 1 min. El efluente se roció por medio de una fuente de iones de nanoelectropulverización en la trampa de iones lineal híbrida del espectro de masas Thermo Scientific Orbitrap Velos Pro (Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved) Los espectros de MS se adquirieron en modo positivo y de perfil utilizando el analizador Orbitrap en el rango de masa/carga (m/z) entre 350 y 1600.

5.3.7 Análisis de datos

Para el análisis de datos de actividad antioxidante por DPPH, ABTS y determinación de proteína soluble Lowry se aplicó un Diseño completamente al azar (DCA) y una comparación de medias con el estadístico de prueba Tukey ($\alpha \leq 0.05$) y fueron analizados con los softwares SAS v.9.4 (SAS Institute Inc), Minitab 17 (Minitab Inc. All rights reserved) y para las gráficas RStudio v.4.2.3(Northern Ave, Boston, Ma). Todos los análisis se realizaron por triplicado. Mientras que para el análisis de péptidos se utilizó la base de datos de Scaffold© (2021–2023 Proteome Software Inc. All rights reserved), para la evaluación de actividad biológica se siguió la metodología de Cui et al. (2022) quienes también emplearon la base de datos BioPep (<https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>).

5.4 Resultados y discusión

5.4.1 Proteína soluble Lowry

Los contenidos de proteína de los extractos peptídicos solubles en agua variaron entre 8.58 ± 0.24 mg/mL en LFA y 9.24 ± 0.44 mg/mL en LFC. Las leches fermentadas no presentaron diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) dado que se utilizó la misma leche para todas y al parecer el consorcio microbiano no influyó en la variable proteína. Bosnea et al. (2017) reportaron valores de 3.33 y 4.49 % en su estudio de yogur con células de *L. casei* inmovilizadas en granos de trigo, la diferencia en el contenido de proteínas puede atribuirse a los ingredientes adicionados y a los compuestos nitrogenados producidos por estos materiales en los yogures producidos con trigo enriquecido con *L. casei*.

5.4.2 Actividad antioxidante

Las fracciones de caseína son precursoras de muchos péptidos bioactivos, incluidos los péptidos antioxidantes. La actividad biológica de los péptidos está determinada por la secuencia de aminoácidos, estructura, configuración y peso molecular. Los péptidos compuestos de triptófano (Trp) tirosina (Tyr), histidina (His) y prolina (Pro), son poderosos antioxidantes. Los aminoácidos hidrofóbicos

leucina (Leu) o valina (Val) presentes en la estructura peptídica afectan la actividad antioxidante de los péptidos y su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica (Bielecka et al., 2022; Power et al., 2013)

En esta investigación se determinó la actividad antioxidante de los péptidos por porcentaje de inhibición de los radicales DPPH Y ABTS^{•+}. Los valores más altos de actividad antioxidante del radical DPPH fue de $55.45 \pm 0.07 \%$ ($p \leq 0.05$) en LFB (Figura 5), Elfahrim et al. (2016) reportaron en su investigación de leche fermentada con *L. helveticus* 1188 que a las 12 h de fermentación presentó actividad antioxidante con el 41.34 %. Sin embargo, Al Zahrani y Shori (2023) en su estudio de bebidas de soja y almendra ambas fermentadas con probióticos *Lactobacillus* spp., reportaron un porcentaje de inhibición de $66.14 \pm 0.028 \%$, esta diferencia puede deberse a las cepas específicas empleadas para la fermentación de la bebida y que el medio de fermentación de origen vegetal. Con los resultados obtenidos se puede inferir que la actividad antioxidante presente en los extractos peptídicos crudos liberados durante la fermentación pueden tener la capacidad de neutralizar los radicales libres DPPH mediante reducción directa, ya sea con transferencia de electrones o mediante un átomo de hidrógeno (Sah et al., 2014), por lo tanto, se puede deducir que las leches fermentadas presentan péptidos con actividad biológica antioxidante.

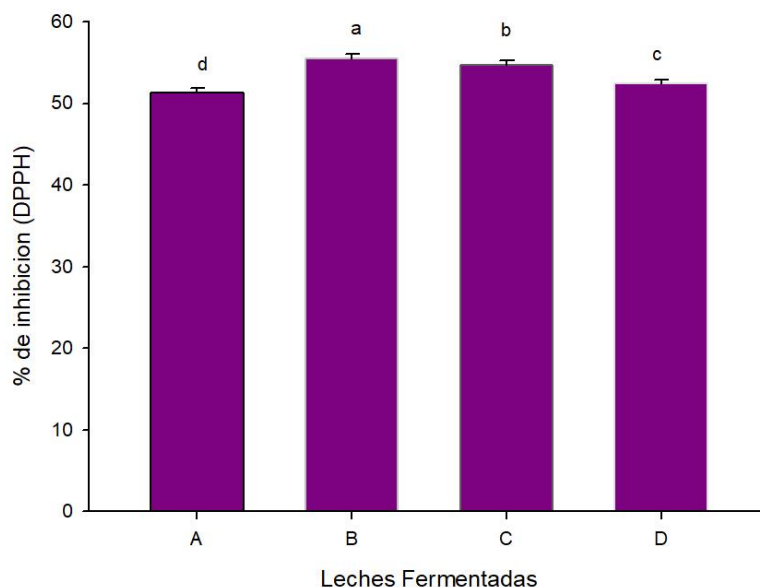


Figura 5. Inhibición de radical DPPH de péptidos de cuatro leches fermentadas.

Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$)

En cuanto a la actividad eliminadora de radicales $ABTS^{\cdot+}$; de acuerdo con el ANOVA, existe diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) entre las cuatro leches fermentadas, siendo la LFA (47.50 ± 0.70 %) y LFD (47 ± 0.01) con mayor porcentaje de “actividad inhibidora” (Figura 6) mientras que la leche con menor porcentaje de inhibición fue LFB. Valores similares reportaron Sah et al. (2016) donde obtuvieron el 50.48 ± 1.77 % en péptidos aislados en un yogur simbiótico, ambos datos se ubican dentro del rango reportado por Virtanen et al. (2007) en su estudio de fracciones de suero obtenidas posterior a la fermentación de leche con diferentes BAL, las cuales evidenciaron actividad eliminadora de radicales de ABTS con una tasa de inhibición de 3 al 53 %. Algunas investigaciones han informado que los péptidos antioxidantes se hidrolizan de las proteínas de la leche mediante fermentación de bacterias ácido lácticas después de 24 h, por lo tanto, se puede decir que las cuatro leches fermentadas en este estudio cuentan con péptidos bioactivos con actividad antioxidante ya que fueron fermentadas por 48 h a temperatura ambiente.

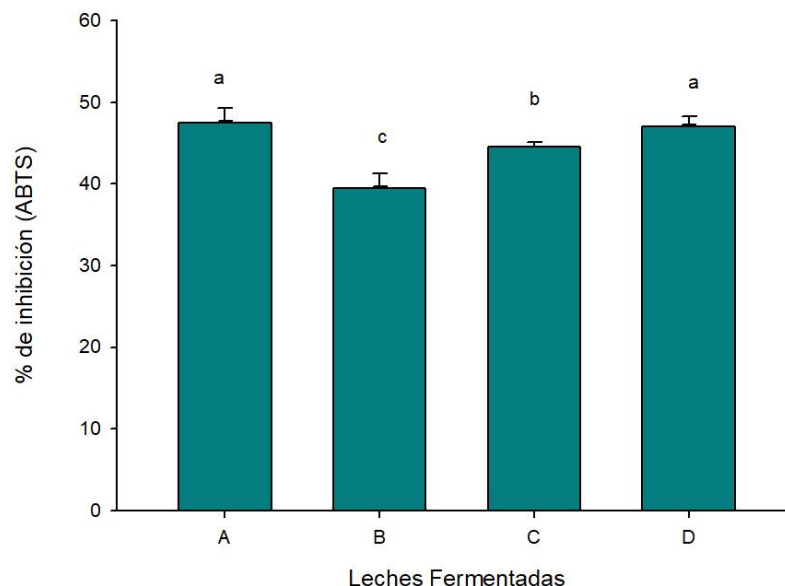


Figura 6. Inhibición de radical ABTS de péptidos en cuatro leches fermentadas.

La capacidad de eliminación de radicales de los antioxidantes para DPPH y ABTS podría ser distinta debido a la diferencia en solubilidad y difusividad en el medio de reacción, sin embargo, se deben tomar en cuenta otros aspectos, por ejemplo, la naturaleza de la muestra para el método DPPH. Se debe considerar si el eliminador de radicales es de naturaleza hidrófila sólo es soluble en medios orgánicos, en especial en medios alcohólicos y no en medios acuosos; dado que el DPPH actúa como indicador de reacción y como sustrato oxidante; por otro lado, el ABTS es soluble en medios acuosos como en medios orgánicos, es decir, con este método se puede evaluar la actividad eliminadora de radicales libres que poseen los antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos (Tang et al., 2010 y Sah et al., 2014).

Autores como Suetsuna et al., (2000) y Phelan et al., (2009) mencionan que la actividad antioxidante de los péptidos se puede atribuir a ciertas secuencias de aminoácidos, a la presencia de enlaces peptídicos o a su estructura y conformación. Algunos aminoácidos hidrófobos se relacionan con el “potencial

antioxidante” de los péptidos (Peña et al., 2004), igualmente Chen et al., (1998) afirman que la hidrofobicidad del péptido también es un factor importante para la actividad antioxidante de éste, debido a la mayor accesibilidad de compuestos hidrófobos v.g. ácidos grasos lipófilos.

5.4.3 Pesos moleculares (SDS-PAGE)

La técnica de separación analítica de alta resolución de mezclas de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) 1D, implica la desnaturalización inicial de las proteínas, dándoles carga negativa proporcional a su masa molecular (Nowakowski et al., 2014). Se determinó la distribución de los pesos moleculares (Figura 7.) de los extractos peptídicos solubles en agua de LFA, LFB, LFC y LFD para su respectivo análisis en LC-MS/MS.

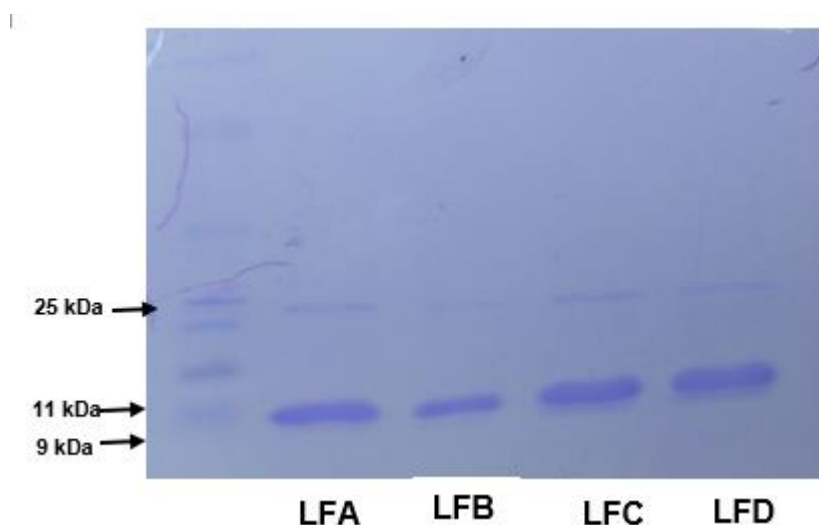


Figura 7. Distribución de pesos moleculares de extractos peptídicos solubles en agua

La matriz polimérica de acrilamida reveló bandas proteicas con pesos moleculares correspondientes a 25, 11 y 9 kDa, por lo tanto, se cree que son α -lactoalbúmina y β -lactoalbúmina, dado que Egger et al. (2019) en su investigación sobre digestión de proteínas de leche encontraron α -lactoalbúmina y β -lactoalbúmina a 19 y 15 kDa, respectivamente. Así mismo, Altuna et al. (2021)

evidenciaron en tres bebidas lácteas la presencia de β -lactoglobulina con peso molecular de 18 a 27 kDa, α -lactoalbúmina 16 kDa, seroalbúminas de 60 a 76 kDa y lactoferrina con un peso molecular de 80 a 85 kDa. Autores como González et al. (2011); Mieray et al. (1997) y Kunji et al. (1996) describen que las proteinasas de las bacterias ácido lácticas tienen la capacidad de hidrolizar más del 40 % de los enlaces peptídicos de las caseínas.

5.4.4 Caracterización de péptidos

Las proteínas extraídas de las cuatro leches fermentadas se sometieron a SDS-PAGE. Las bandas de pesos moleculares menores a 15 kDa (ver figura 7) se cortaron, procesaron y se sometieron a LC-MS/MS. Los resultados obtenidos del espectrómetro de masas fueron 33 proteínas totales que se muestran en el cuadro 4. El software bioinformático Proteome Discoverer v.1.4.1.14 ayuda a identificar proteínas de mayor similitud con una base de datos, en este caso fue con *Bos taurus*. Se observó que hubo presencia de β -lactoglobulina, β -caseína, α -lactoalbúmina κ -caseína y α -S1-caseína, por mencionar algunos. Así mismo, para obtener las características de las secuencias peptídicas derivadas de las proteínas totales se sometieron al software Scaffold 5 (<https://www.proteomesoftware.com/products/scaffold-5>) donde se obtuvieron las secuencias de aminoácidos, mismas que posteriormente se emplearon para evaluar la actividad biológica *in silico* en la base de datos BIOPEP-UWM (<https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>).

Cuadro 4. Proteínas encontradas en LF con granos de kéfir en Scaffold 5.

No.	Proteínas identificadas	ID Alterno	No. Accesoión (UniProt)	P.M (kDa)	LFA (%)	LFB (%)	LFC (%)	LFD (%)
1	*Alérgeno principal beta-lactoglobulina	-	B5B0D4	20	79	79	79	84
2	*Beta-lactoglobulina	LGB	P02754	20	79	79	79	79
3	*Alfa-lactoalbúmina	LALBA	A0A452DI34 (+1)	19	63	60	68	70
4	*Variante D de beta-lactoglobulina (Fragmento)	LGB	O77777	5	98	98	98	98
5	Beta-caseína	CSN2	A0A452DHW7	29	33	-	29	54
6	Beta-caseína	CSN2	A0A4W2IPU8	29	29	-	29	35
7	Beta-caseína	CSN2	A0A4W2EW77	29	29	-	18	35
8	Kappa-caseína	CSN3	A0A140T8A9 (+2)	21	33	15	30	37
9	Kappa-caseína (Fragmento)	CSN3	K9ZSD8	14	42	-	28	48
10	Alfa-S1-caseína	CSN1S1	P02662	25	11	6.1	19	26
11	*Beta-caseína (Fragmento)	-	A0A145YPD8	9	90	29	80	90
12	Alfa-S1-caseína	CSN1S2	P02663	26	17	0.0	5.0	20
13	*Beta-caseína (Fragmento)	CSN2	A0A0M4FTE5	12	60	-	-	77
14	Cadena ligera de inmunoglobulina, grupo de genes lambda	IGL	Q1RMN8	25	21	14	21	21
15	Glicoproteína ácida alfa-1	LOC113897706	A0A4W2FFC5 (+1)	23	33	15	27	33
16	Glicoproteína 2	GP2	A0A3Q1M193 (+2)	58	15	0.0	2.9	15
17	Molécula de adhesión celular dependiente de glicosilación 1	GLYCAM1	P80195	17	29	-	-	29
18	Albúmina	ALB	A0A4W2D8T3	74	10	-	3.4	11
19	Proteína fijadora de ácidos grasos 3	FABP3	A0A4W2FMN0	19	18	-	-	18
20	Receptor de inmunoglobulina polimérico	PIGR	A0A4W2FHG6	86	3.3	-	3.3	4.20
21	Osteopontina-K	-	P31098	31	5.8	-	5.8	5.80
22	Ribonucleasa pancreática	RNASE1	P61823	16	42	14	28	42
23	Alfa-S1-caseína	CSN1S1	A0A4W2IJH7	23	-	-	-	12
24	Prostaglandina D2 sintasa	PTGDS	A0A3Q1MGM5	21	15	-	-	21

25	Serina/treonina-proteína quinasa 40	STK40	Q17QV9	49	2.3	2.30	2.3	2.30
26	Ortólogo KIAA1109	KIAA1109	A0A4W2DXW7 (+1)	555	0.4	-	-	0.40
27	Transportador de colesterol intracelular 2 NPC	NPC2	P79345	17	22	-	8.7	6.70
28	Obscurina, calmodulina citoesquelética y RhoGEF que interactúa con titina	OBSCN	A0A4W2F8X8	862	0.1	0.10	-	-
29	Miosina IXA	MYO9A	A0A4W2IQH2 (+1)	292	0.4	0.0	-	0.0
30	Proteína que contiene dominio de unión al ADN tipo HSF	-	A0A4W2BNI4 (+5)	48	2.6	-	-	2.6
31	Receptor 2 de rianodina	RYR2	E1BHV1	557	0.0	-	0.3	-
32	Proteína que contiene dominio de transcriptasa inversa	-	A0A4W2DES4	66	3.7	-	-	0.0

Uniprot = Base de datos de proteínas. - = Ausente. **P.M** = Peso Molecular. **KDa** = kilo Daltons. **LFA** = Leche fermentada productor A. **LFB** = Leche fermentada productor B. **LFC** = Leche fermentada productor C. **LFD** = Leche fermentada productor D. **Fuente:** Elaboración propia con datos experimentales, * = Proteínas seleccionadas para determinar péptidos bioactivos.

Seis de las 33 proteínas presentaron mayor porcentaje de identidad (> 60 %) comparado con proteínas y péptidos de la base de datos *Bos taurus*. En el Cuadro 5 se observa que derivado de las seis proteínas seleccionadas se tiene un total de 3691 péptidos. Las proteínas con mayor abundancia son Alérgeno principal β -lactoglobulina, β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina y β -caseína (Fragmento)

De los péptidos totales (3691) se divide en diferentes actividades biológicas como: antiinflamatoria, anticancerígena, inhibidor ACE, antibacterial, estimulante de la captación de glucosa, ansiolítico y antiinflamatorio, por mencionar algunas.

Cuadro 5. Péptidos más abundantes presentes en seis proteínas de LF.

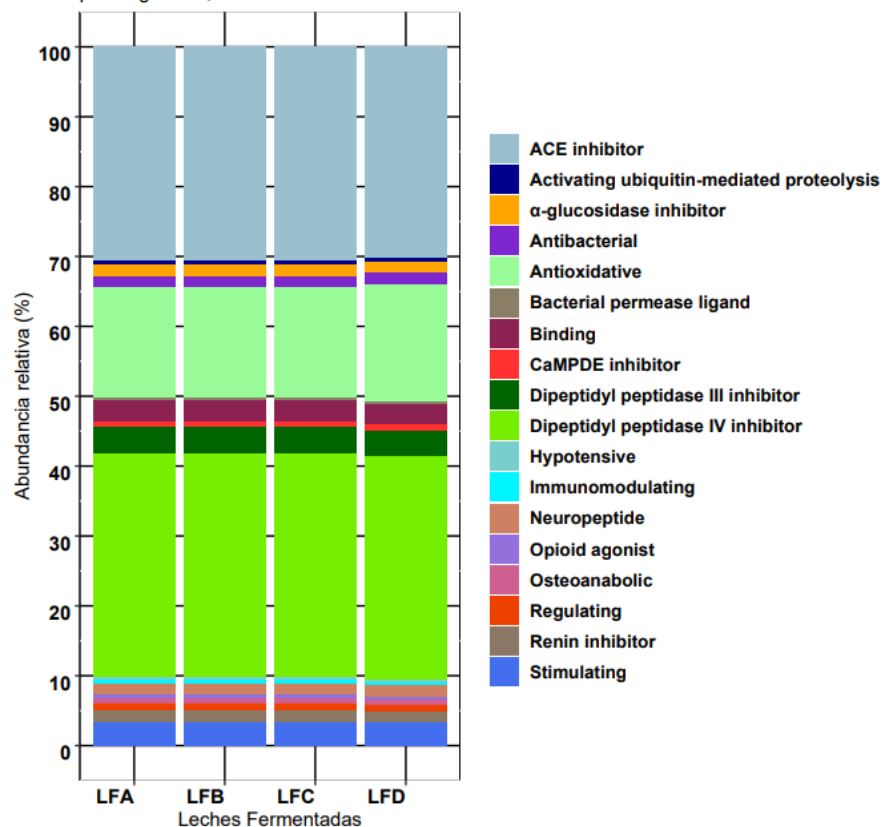
Proteína	LFA	LFB	LFC	LFD
Alérgeno principal β -lactoglobulina	235	235	235	244
β -lactoglobulina	237	237	237	237
α -lactoalbúmina	145	138	156	158
Variante D de β -lactoglobulina (Fragmento)	93	93	93	93
β -caseína (Fragmento)	176	40	162	176
β -caseína (Fragmento)	128	-	-	143
Total de péptidos en cada leche fermentada	1014	743	883	1051

LFA = Leche fermentada productor A. LFB = Leche fermentada productor B, LFC = Leche fermentada productor C, LFD = Leche fermentada productor D. Fuente: Elaboración propia con datos experimentales.

Las proteínas Alérgeno principal β -lactoglobulina y β -lactoglobulina ambas con peso molecular de 20 kDa, con ID B5B0D4 y P02754, respectivamente, en la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/>), se presentaron en las cuatro leches fermentadas. En la Figura 8 se muestran que ambas proteínas presentaron 18 péptidos con actividad biológica. Cabe destacar que los péptidos con mayor presencia son **inhibidor dipeptidil peptidasa IV**, **inhibidor ACE** y **antioxidante**, aunque también se presentan otros con porcentaje menor al 1 %,

como antibacterial, hipotensivo y neuropéptido. Abdel et al. (2019) evaluaron actividad biológica en leche fermentada por *Lactobacillus casei* ATCC 393 la cual presentó actividad biológica inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), y anticancerígena, a diferencia de los resultados obtenidos en esta investigación donde la actividad biológica de los péptidos fue evaluada *in silico*, mientras que Abdel et al. (2019) realizaron pruebas experimentales *in vitro*.

A Péptidos con Actividad Biológica en Leches Fermentadas
β-lactoglobulin, PM = 20 kDa



B Péptidos con Actividad Biológica en Leches Fermentadas
β-lactoglobulin, PM = 20 kDa

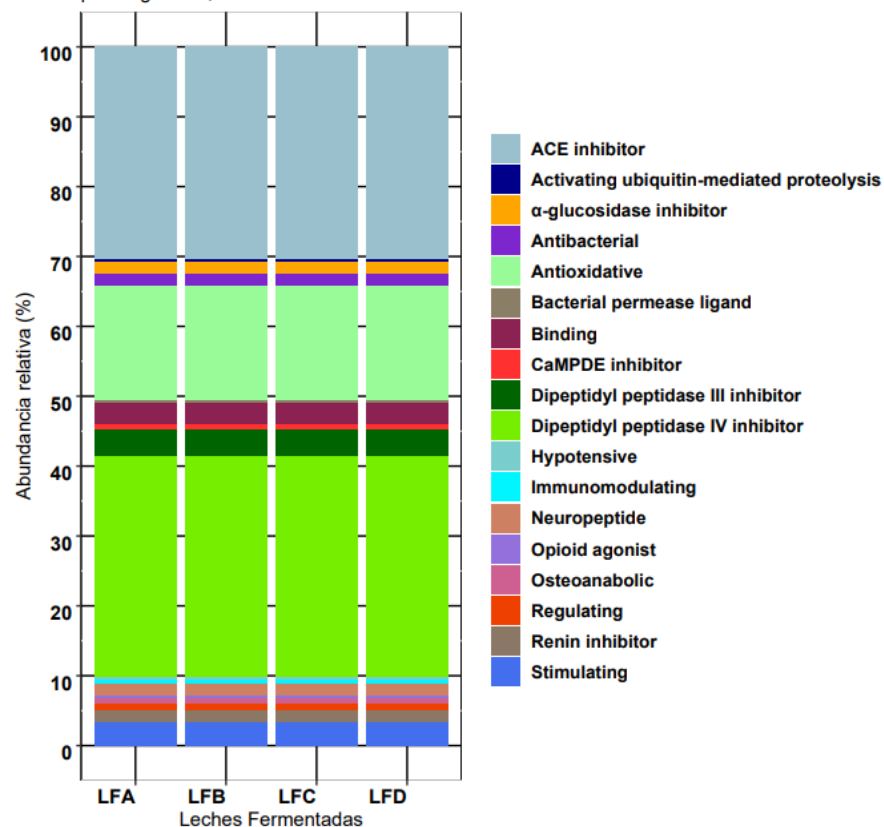
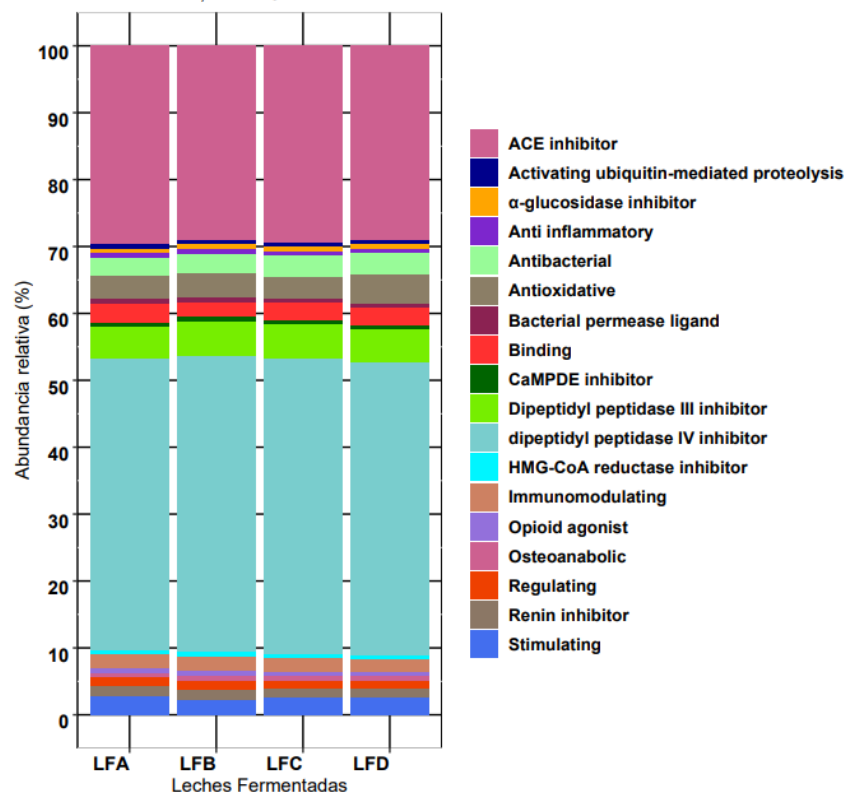


Figura 8. Péptidos presentes en las proteínas β-lactoglobulina ID B5B0D4 y β-lactoglobulina ID P02754.

PM =peso molecular LFA = Leche fermentada productor A. LFB = Leche fermentada productor B, LFC = Leche fermentada productor C, LFD = Leche fermentada productor D. Fuente: Elaboración propia con datos experimentales.

Las proteínas α -lactoalbúmina y Variante D- β -lactoglobulina (fragmento) ID A0A452D134(+1) y O77777 con 18 y 13 péptidos y pesos moleculares de 19 y 5 kDa, respectivamente, fueron encontrados en las cuatro leches fermentadas (Figura 9). En la proteína α -lactoalbúmina se observan dos péptidos distintos a los de la figura 8 (inhibidor de HMG-CoA reductasa y el antiinflamatorio, aunque los más representativos para esta proteína son: **inhibidor dipeptidil peptidasa IV, inhibidor ACE, antioxidante y antibacterial**. Mientras que para la Variante D- β -lactoglobulina los péptidos más representativos son: **inhibidor ACE, inhibidor dipeptidil peptidasa III y IV, antioxidante** cabe mencionar que la **proteína** Variante D- β -lactoglobulina (fragmento) contienen mayor presencia de péptidos antioxidantes que la α -lactoalbúmina. Regazzo et al. (2010) reportaron que leches fermentadas con *Enterococcus faecalis* TH563, *L. delbrueckii bulgaricus* LA2 aislados de productos lácteos italianos mostraron actividad inhibidora de ACE e inmunomoduladora y antihipertensiva, posiblemente Regazzo y colaboradores encontraron menos péptidos con actividad biológica debido a que solo emplearon dos especies de cultivos iniciadores y por lo tanto no hubo una mayor degradación de las proteínas por parte de los microorganismos empleados.

A Péptidos con Actividad Biológica en Leches Fermentadas
α-lactoalbumin, PM = 19 kDa



B Péptidos con Actividad Biológica en Leches Fermentadas
β-lactoglobulin variant D (fragment), PM = 5 kDa

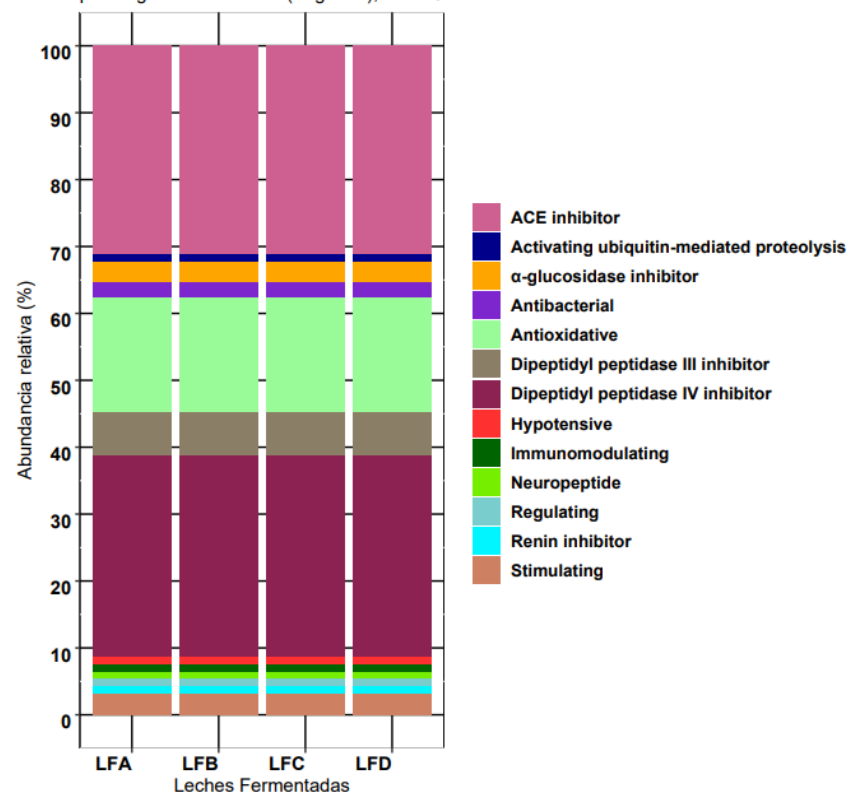


Figura 9. Peptidos encontrados en proteínas: α-lactoalbúmina ID A0A452D134(+1) y Variante D-β-lactoglobulina (fragmento) ID O77777.

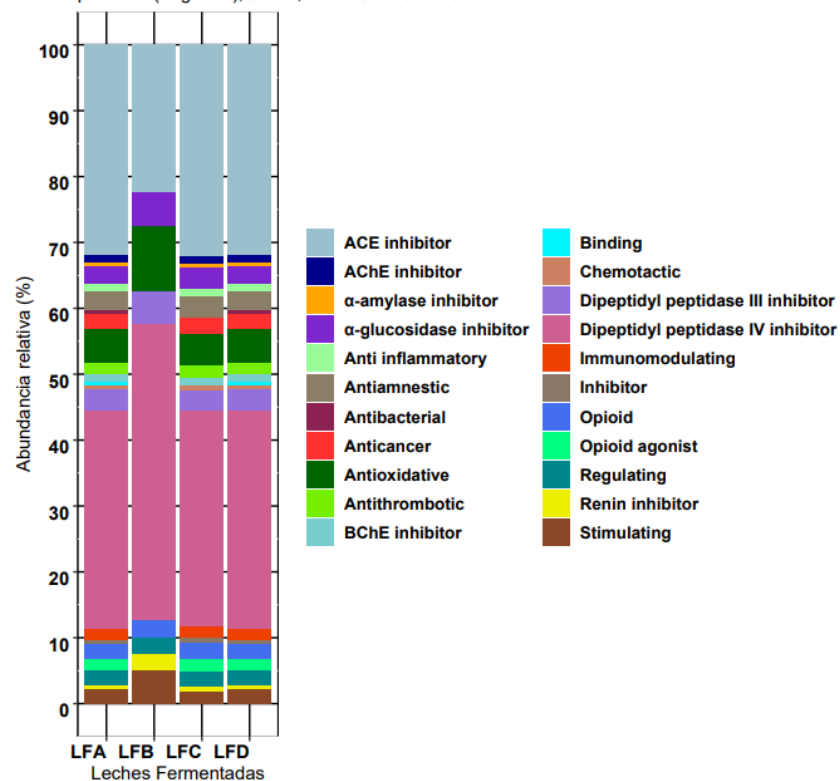
PM = peso molecular LFA = Leche fermentada productor A. LFB = Leche fermentada productor B, LFC = Leche fermentada productor C, LFD = Leche fermentada productor D. Fuente: Elaboración propia con datos experimentales.

Las proteínas β -caseína con ID A0A145YPD8 y A0A0M4FTE5 en la base de datos UniProt, y pesos moleculares de 9 y 12 kDa, respectivamente, fueron encontrados de 16 a 22 péptidos bioactivos en las cuatro leches fermentadas. En la proteína A0A145YPD8 se observan péptidos con actividad biológica (ver Figura 10) **inhibidor dipeptidil peptidasa III y IV, inhibidor ACE, antioxidante, antiamnésico, anticancerígeno**, cabe destacar que la leche fermentada B no presentó 13 péptidos bioactivos, entre ellos el anticancerígeno.

Finamente, la proteína A0A0M4FTE5 (β -caseína) con 12 kDa de PM presentó 16 péptidos con actividad biológica, esta proteína solo se encontró en las leches fermentadas A y D; los principales péptidos con actividad biológica de ésta proteína fueron: **inhibidor dipeptidil peptidasa III y IV, inhibidor ACE, antioxidante, anticancerígeno**, así mismo, el péptido antiamnésico solo se encuentra en la leche fermentada D.

Se sabe que el cáncer es un importante problema de salud en casi todo el mundo y el tratamiento suele ser muy costoso, es por ello que ha aumentado la búsqueda de otras alternativas para contrarrestar esta enfermedad, y una de éstas es el tratamiento con alimentos funcionales y suplementos nutricionales, Hatmal et al. (2018) evaluaron las condiciones de fermentación de los granos de kéfir y el potencial anticancerígeno, determinando que los factores que influyen significativamente en las propiedades anticancerígenas son, el tiempo de fermentación y la proporción kéfir – leche; también observaron que en tiempos de fermentación cortos (24 a 48 h) se produjeron perfiles anticancerígenos superiores con tiempos más largos de fermentación (72 h), esto debido al consumo bioquímico de las BAL. En relación a lo mencionado anteriormente se sustenta el haber encontrado péptidos con actividad anticancerígena en esta investigación ya que las leches se fermentaron 48 h.

A Péptidos con Actividad Biológica en Leches Fermentadas
β-casein (fragment), 9 kDa, ID = A0A145YPD8



B Péptidos con Actividad Biológica en Leches Fermentadas
β-casein (fragment), 12 kDa, ID = A0A0M4FTE5

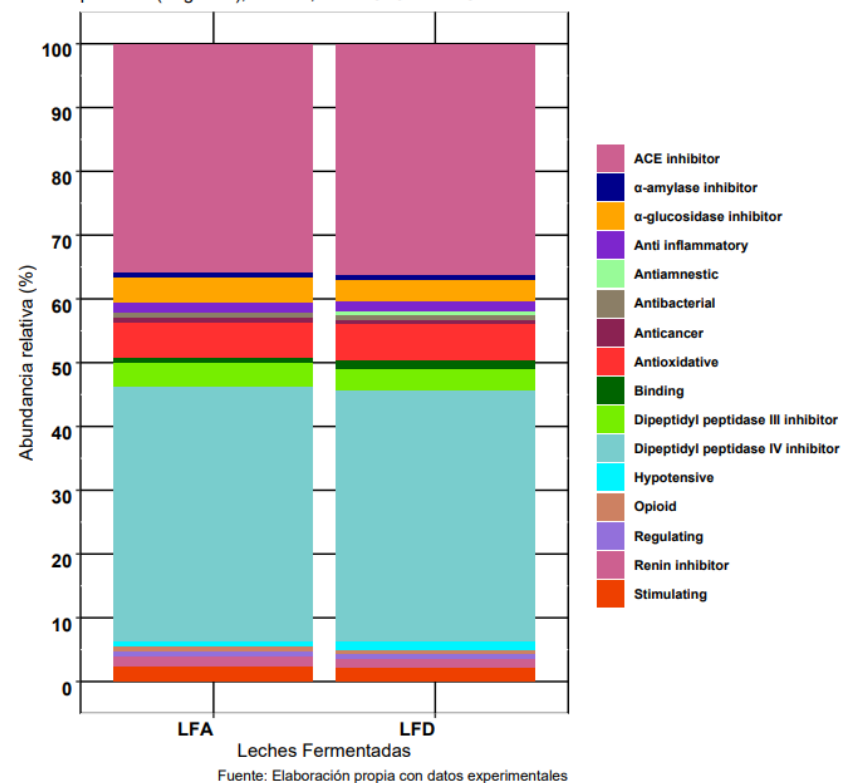


Figura 10. Péptidos con actividad biológica encontrados en proteínas β-caseína con ID A0A145YPD8 y A0A0M4FTE5

PM = peso molecular LFA = Leche fermentada productor A. LFB = Leche fermentada productor B, LFC = Leche fermentada productor C, LFD = Leche fermentada productor D. Fuente: Elaboración propia con datos experimentales.

Del total de péptidos entre las cuatro leches fermentadas, se manifestaron 29 funciones biológicas diferentes, de las cuales se seleccionaron algunas secuencias para investigar sus propiedades biológicas *in silico*, mismas que se muestran en el cuadro 6 donde se reportan las propiedades fisicoquímicas de 24 secuencias de aminoácidos. Se empleó la base de datos PepDraw (<https://pepdraw.com/>) para identificar las propiedades fisicoquímicas de los péptidos, para ello se eligió un péptido de cada actividad biológica portadora en las leches fermentadas. Los resultados mostraron valores de hidrofobicidad de 6.13 a 18.39 kcal·mol⁻¹; punto isoeléctrico de ácido (3.74) a básico (11.11); masas 269.13 a 1744.86 Da y cargas neutras, positivas y negativas 0, +1, -2 -1 respectivamente. Chauhan et al. (2023) aseveran que las funciones de las proteínas están determinadas por su estructura única dada por sus composiciones y pliegues de aminoácidos (AA), es decir aquellas proteínas que tengan secuencias de aminoácidos similares, tendrán bioactividad, estructura y función similar.

Los péptidos bioactivos de las proteínas lácteas revelan propiedades multifuncionales, incluyen una variedad de sustancias moduladoras en diversos procesos regulatorios en el cuerpo. Dentro de los péptidos bioactivos se encuentran los péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), pueden ejercer efecto antihipertensivo. Los péptidos inmunomoduladores de caseína estimulan la proliferación de linfocitos humanos y la actividad fagocítica de los macrófagos. Los péptidos antimicrobianos inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos (Mesiel et al. 1998), como *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Cuadro 6. Propiedades Fisicoquímicas de péptidos encontrados por LC-MS/MS

Actividad biológica	Secuencia	PM (Da)	pI	Hidrofobicidad Kcal*mol ⁻¹	carga neta
Agonista opoide	YPFPGPIPNL	1200.6	5.48	+6.13	0
Ansiolítico	YL	294.15	5.48	+594	0
Antiaminico	VYPFPGPI	888.47	5.55	+5.47	0
Antibacterial	IPAVFK	744.45	10.15	+8.55	+1
Anticancerígeno	PGPIP	593.3	5.44	+9.20	0
Antiinflamatorio	IPP	325.19	5.23	+7.06	0
Antioxidante	YVEEL	651.31	3.03	+12.74	-2
Antitrombótico	PGP	269.13	5.25	+9.33	0
BChE inhibidor	YPFPG	579.26	5.50	+6.91	0
Estimulante (Péptido estimulante de la captación de glucosa)	LV	230.16	5.63	+6.19	0
Hipotensivo	AA	160.08	5.61	+8.90	0
HMG-CoA reductasa inhibidor	GGV	231.12	5.64	+9.74	0
Inhibidor CaMPDE	KF	293.17	9.80	+8.99	+1
Inhibidor de ACE	ALPMHIR	836.46	11.18	9.64	+1
Inhibidor de la alfa- glucosidasa	LR	287.19	11.11	+8.46	+1
Inhibidor de la dipeptidil peptidasa III	LKPTPEGDL	1323.72	3.74	+18.41	-2
Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	LKPTPEGDL	968.5162	4.01	+17.15	-1
Inhibidor de renina	LR	287.19	11.11	+8.46	+1
Inmonomodulador	VAGTWY	695.32	5.45	+6.54	0
Neuropéptido	HIRL	537.33	10.91	+9.67	+1
Opoide	YPVEPF	750.35	3.14	+8.93	-1
Osteoanabólico	YVEEL	651.31	3.03	+12.74	-2
Regulador(péptido que regula la actividad de la membrana mucosa del estómago)	PGP	269.13	5.25	+9.33	0
Vinculante	HKEMPFKYPVEPF	1744.86	7.63	+18.39	0

PM = peso molecular, PI= punto isoeléctrico, LFA = Leche fermentada productor A. LFB = Leche fermentada productor B, LFC = Leche fermentada productor C, LFD = Leche fermentada productor D. Fuente: Elaboración propia con datos experimentales.

5.5 Conclusiones

La identificación y cuantificación de péptidos bioactivos en productos lácteos fermentados o en alimentos funcionales es una tarea difícil ya que las leches fermentadas se consideran muestras complejas dado que pueden contener cientos de péptidos diferentes y en diversas concentraciones. Se caracterizaron las proteínas de cuatro leches fermentadas mediante electroforesis (SDS-PAGE), donde las principales proteínas encontradas fueron β -lactoglobulina con pesos moleculares de 5 y 20 kDa, α -lactoalbúmina (19 kDa) y β -caseína (9 y 12 kDa). Igualmente, con el análisis de LC-MS/MS se identificaron 3691 péptidos bioactivos, mismos que se generaron por acción de las BAL al fermentar la leche. Los resultados obtenidos en la presente investigación son prometedores ya que la leche fermentada con granos de kéfir es una bebida casera de fácil acceso para la población y que posee beneficios a la salud.

5.6 Agradecimientos

Al laboratorio Universitario de Proteómica, en particular a la M.C. Lorena Hernández Orihuela.

Al laboratorio 19 de Biología Molecular de Plantas, en especial al M. en B. Juan Elías Olivares Grajales.

5.7 Literatura citada

- Abdel-Hamid, M., Romeih, E., Gamba, R. R., Nagai, E., Suzuki, T., Koyanagi, T., y Enomoto, T. (2019). The biological activity of fermented milk produced by *Lactobacillus casei* ATCC 393 during cold storage. *International Dairy Journal*, 91, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.12.007>
- Al Zahrani, A. J y Shori, A. B. (2023). Viability of probiotics and antioxidant activity of soy and almond milk fermented with select strains of Probiotic *Lactobacillus* spp. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 176(114531), 114531. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114531>
- Altuna, J., Barrionuevo, A., Bayas, F., Verdezoto, R., y Coloma. (2021). Caracterización de proteínas obtenidas de tres productos lácteos

- desarrollados en la cooperativa de producción agropecuaria salinas. *Ciencia y Tecnología*, 14(2).77-80. <https://doi.org/10.18779/cyt.v14i2.506>
- Bielecka, M., Cichosz, G., y Cieczot, H. (2022). Antioxidant, antimicrobial and anticarcinogenic activities of bovine milk proteins and their hydrolysates. A review. *International Dairy Journal*, 127(105208), 105208. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105208>
- BIOPEP-UWM- Katedra Biochemii Zywnosci.
<https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>
- Bosnea, L. A., Kopsahelis, N., Kokkali, V., Terpou, A., y Kanellaki, M. (2017). Production of a novel Probiotic yogurt by incorporation of L. casei enriched fresh Apple pieces, dried raisins and wheat grains. *Food and Bioprocess Processing*, 102, 62-71. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.11.010>
- Chauhan, R., Bhattacharya, J., Solanki, R., Ahmad, F. J., Alankar, B., y Kaur, H. (2023). GUD.VE visualization tool for physicochemical properties of proteins. *Methods X*, 10, 102226. <https://doi.org/10.1016%2Fj.mex.2023.102226>
- Chen, H. M., Muramoto, K., Ymauch, F., y Nokihara, K. (1996). Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digest of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2619-2623.
- Cui, L., Yang, G., Lu, S., Zeng, X., He, J., Guo, Y., Pan, D., y Wu, Z. (2022). Antioxidant peptides derived from hydrolyzed milk proteins by Lactobacillus strains: A BIOPEP-UWM database-based analysis. *Food Research International* (Ottawa, Ont.), 156, 111339. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111339>
- De Lima, M. dos S. F., da Silva, R. A., da Silva, M. F., da Silv, P. A. B., Costa, R. M. P. B., Teixeira, J. A. C., Porto, A. L. F., y Cavalcanti, M. T. H. (2018). Brazilian Kefir-fermented sheeo's milk, a source of antimicrobial and antioxidant peptides. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(3), 446-455. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9365-8>
- Egger, L., Ménard, O., Delgado-Andrade, C., Alvito, P., Assuncao, R., Balance, S., Barberá, R., Brodkorb, A., Ctenoz, T., Clemente, A., Comi, I., Dupont, D., Garcia-Llatas, G., Lagarda, M.J., Le Feunteun, S., JanssenDuijghuijsen, L., Karakaya, S., Lesmes, U., Mackie, A.R., Portmann, R. (2016). The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action. *Food Research International* (Ottawa, Ont.) 88, 217-225. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.006>
- Elfahri, K. R., Vasiljevic, T., Yeager, T., y Donkr, O. N. (2016). Anti-colon cancer and antioxidant activities of bovine skim milk fermented by selected Lactobacillus helveticus strains. *Journal of Dairy Science*, 99(1), 31-40. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10160>

- Fuglsang, A., Nilsson, D., y Nyborg, N. C. B. (2003). Characterization of new milk-derived inhibitors of angiotension converting enzyme in vitro and in vivo. *Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry*, 18(5), 407-412. <https://doi.org/10.1080/1475636031000138723>
- Hatmal, M. M., Nuirat, A., Zihlif, M. A., y Taha, M. O. (2018). Exploing the influence of culture conditions on kefir's anticancer propertis. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3771-3777. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13539>
- Havlis, J., Thomas, H., Sebela, M., & Shevchenko, A. (2003). Fast-response proteomics b accelerated in gel digestion of proteins. *Analytical Chemistry*, 75(6), 11300-1306. <https://doi.org/10.1021/ac026136s>
- Kilara, A., y Panyam, D. (2003). Pptides from milk proteins and their properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(6), 607-633. <https://doi.org/10.1080/10408690390251138>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of steuctural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275. ISSN 00219258
- Meisel, H. (1998). Overview on milk protein-derived. *International Dairy Journal*, 8(5-6), 363-373. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(98\)00059-4](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(98)00059-4)
- Minkieewicz P., Iwaniak A., Darewicz M. (2019). BIOPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: Current Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, [20,5978](https://doi.org/10.3390/ijms/20235978). <https://doi.org/10.3390/ijms/20235978>.
- Mulero-Cánovas, J., Zafrilla-Rentero, P., Martínez-Cachá, M.A., Leal H. M., y Abellán, A. J. (2011). Péptidos bioactivos. *Clínica e Investigación en Arterioesclerosis: Publicación Oficial de la Sociedad Española de Arterioesclerosis*, 23(5), 219-227. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2011.04.004>
- Nowakowski, A. B., Wobing, W. J., y Petering, D. H. (2014). Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, 6(5), 1068-1078. <https://doi.org/10.1039/c4mt00033a>
- Peña-Ramo, E. A., Xiong, Y. L., y Arteaga, G. E. (2004). Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(14), 1908-1918. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1886>
- Phelan, M., Aherne, A., FitzGerald, R. J., y O'Brien, N. M. (2009). Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and

- regulatory status. *International Dairy Journal*, 19(11), 643-654. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.06.001>
- Pomory, C.M. (2008). Color development time of the Lowry protein assay. *Analytical Biochemistry*, 378(2), 216-217. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.04.015>
- Posit Team (2023). RStudio: Integrated development environment for R. Posit Software, PBC, Boston, MA. URL <http://www.posit.co/>.
- Power, O., Jakeman, P., y FitzGerald, R. J. (2013). Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids*, 44(3), 797-820. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1393-9>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicl Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Regazzo, D., Da Dalt, L., Lombardi, A., Andrichetto, C., Negro, A., y Gabai, G. (2010). Subsp. *Bulgaricus* LA2 manifest different degrees of ACE-inhibitory and immunomodulatory activities. *Health*, 11, 18. <https://doi.org/10.1051/dst/2010009>
- Rodríguez, R. R., Batista, C. V. F., Coronas, F. I. V., Zamudio, F. Z., Hernández, O. L., Espinosa, L. G., Ruiz, U. A., y Possni, L. D. (2015). Comparative proteomic analysis of male and female venoms from the Cuban scorpion *Rhopalurus junceus*. *Toxicon: Oficial Journal of the International Society on Toxinology*, 107, 327-334. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.06.026>
- Sah, B. N. P., Vasilijec, T., McKechnie, S., y Donkor, O. N. (2014). Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. *Food Chemistry*, 156, 264-270. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.105>
- Sah, B. N. P., Vasiljevic, T., McKechnie, S., y Donkor, O. N. (2016). Antioxidant peptides isolated from synbiotic yogurt exhibit antiproliferative activities against HT-29 colon cancer cells. *International Dairy Journal*, 63, 99-106. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.08.003>
- Sanders, M. E. (1998). Overview of functional foods: Emphasis on Probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 8(5-6), 341-347. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00056-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00056-9)
- Suetsuna, K., Ukeda, H., y Ochi, H. (2000). Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *The Journal of nutritional biochemistry*, 11(3), 128-131. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(99\)00083-2](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(99)00083-2)

- Sun, W., Gao, S., Wang, L., Chen, Y., Wu, S., Wang, X., Zheng, D., & Gao, Y. (2006). Microwave-assisted protein preparation and enzymatic digestion in proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 5(4), 769–776. <https://doi.org/10.1074/mcp.t500022-mcp200>
- Tang, X., He, Z., Dai, Y., Xiong, Y. L., Xie, M., y Chen, J. (2010). Peptide fractiona and free radical scavenging activity of Zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 587-593. <https://doi.org/10.1021/jf9028656>
- Urso, M. L., y Clarkson, P. M. (2003). Oxidative stress, excercis, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189(1-2), 51-54. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(03\)00151-3](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(03)00151-3)
- Virtanen, T., Pohlanto, A., Akkanen, S., y Korhonen, H. (2007). Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), 106-115. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03072.x>
- Yamamoto, N., Maeno, M., y Takano, T. (1999). Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *Journal of Dairy Science*, 82(7), 1388-1393. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(99\)75364-6](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(99)75364-6)
- Yu, Y., Yu, W., y Jin, Y. (2021). Peptidomic analysos of milk fermented by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Food Hydrocolloids for Health*, 1(100033), 100033. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2021.100033>

6. CONCLUSIONES GENERALES

Las cuatro leches fermentadas con granos de kéfir demostraron tener BAL y levaduras viables después de 48 h de fermentación, cuentas que son aceptables para considerarse como alimento probiótico, las cuentas de BAL que se obtuvieron van de $7.25 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ a $11.13 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ y en levaduras de $6.05 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ a $7.93 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$.

El análisis de secuenciación metagenómica shotgun, reveló la presencia 77 géneros de microorganismos donde los más representativos fueron *Acetobacter* (73.8%), *Lactobacillus* (19.6 %), *Lentilactobacillus* (3.9 %), *Lactococcus* (0.76 %), igualmente se identificaron ocho especies más representativas *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Acetobacter orientalis*, *Lactobacillus helveticus*, *Acetobacter syzygii*, *Acetobacter okinawensis*, *Lentilactobacillus kefir* y *Lactococcus lactis*.

El análisis proteómico mediante (LC-MS/MS) detectó la presencia de 3691 péptidos, de los cuales se encontraron actividades biológicas in silico importantes como antiinflamatoria, inhibidora de ACE, antibacterial, inhibidor de DPP – III y IV, antitrombótico, anticancerígeno y antioxidante.

Los resultados obtenidos demuestran que el uso de las ciencias ómicas (metagenómica y proteómica) son importantes para conocer la relación entre el consorcio microbiano y la actividad biológica de los alimentos. Finalmente se dice que las leches fermentadas con granos de kéfir representan una opción viable para obtener una bebida fermentada con propiedades funcionales y biológicamente activas, además de ser un producto de bajo costo y de fácil preparación.