



PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS FIJADORES DE CALCIO Y HIERRO POR *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712

CALCIUM AND IRON BINDING PEPTIDES PRODUCTION BY *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712

C. Figueroa-Hernández^{1*}, A. Cruz-Guerrero¹, G. Rodríguez-Serrano¹, L. Gómez-Ruiz¹, M. García-Garibay^{1,2}
y J. Jiménez-Guzmán¹

¹Departamento de Biotecnología Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa., Av. San Rafael Atlixco No. 186 Col. Vicentina, México D.F. 09340, México.

²Departamento de Ciencias de la Alimentación, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Lerma. Av. Hidalgo Poniente 46, Colonia La Estación, CP 52006, Lerma de Villada, Edo. de México, México.

Recibido 28 de Mayo 2012; Aceptado 5 de Julio 2012

Resumen

Lactococcus lactis es una bacteria que presenta un alto potencial de generación de péptidos bioactivos. Una de las actividades más importantes que ejercen los péptidos bioactivos es la fijación de minerales como el calcio, hierro y zinc. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del pH en la producción de péptidos fijadores de calcio y hierro en fermentaciones con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712. Se observó que en la fermentación con control de pH se favoreció la producción de péptidos fijadores de calcio (0.28 mmoles de Ca²⁺ mg⁻¹ de proteína), con respecto a la fermentación sin control de pH (0.23 mmoles de Ca²⁺ mg⁻¹ de proteína). Existe una correlación entre la actividad proteolítica y el calcio fijado por los sobrenadantes de las fermentaciones con y sin control de pH. En cuanto a la actividad fijadora de hierro se observó un aumento en la fermentación con control de pH con respecto a la fermentación sin control, en la cual se mantuvo la actividad fijadora inicial propia de las proteínas de la leche. Se encontró que los pesos moleculares de algunos de los péptidos generados coinciden con los pesos moleculares de secuencias reportadas como fijadoras de calcio y hierro.

Palabras clave: péptidos bioactivos, *Lactococcus lactis*, hierro fijado, calcio fijado.

Abstract

Lactococcus lactis is a bacteria with a high potential of bioactive peptide production. One of the most important activities of these peptides is metal chelating activity especially of calcium, iron and zinc. The aim of this work was evaluated the effect of pH on calcium and iron chelating peptides production in fermentations by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712. It was observed that during fermentation with pH control, the production of calcium binding peptides (0.28 mmol Ca²⁺ mg⁻¹ protein) was improved, with respect to fermentation without pH control (0.23 mmol Ca²⁺ mg⁻¹ protein). There is a correlation between proteolytic activity and calcium-binding activity by the supernatants of fermentations with or without pH control. As for the iron-binding activity was observed an increase in the fermentation with pH control with respect to fermentation without control, which was maintained as the initial binding activity characteristic of the milk proteins. It was found that the molecular weights of some of the peptides generated match with the sequence reported molecular weights and calcium and iron binding.

Keywords: bioactive peptides, *Lactococcus lactis*, iron-binding, calcium-binding.

*Autora para la correspondencia. E-mail: claudiafigueroa26@gmail.com
Tel. +(52 55) 5804-4720; Fax: +(52 55) 5804-4712

1 Introducción

La deficiencia en la ingesta de algunos minerales como el calcio, hierro y zinc es un problema de salud a nivel mundial. Se ha visto que deficiencias en la ingesta de hierro pueden afectar a la mitad de la población mundial, presentándose en un 35% en los niños y en un 42% en las mujeres. La deficiencia en la ingesta de hierro provoca problemas en el funcionamiento del sistema inmune (Bouglé y Bouhallab, 2006), mientras que la deficiencia en la ingesta de calcio puede provocar el desarrollo de osteoporosis. La osteoporosis afecta al 20% de las mujeres postmenopáusicas en EE.UU y a 7.8 millones a nivel mundial (Heaney, 2000). Es por ello que se buscan alternativas que permitan aumentar la fijación de minerales en el cuerpo. Una de las alternativas son los péptidos fijadores de minerales. Los péptidos fijadores de minerales o caseinofosfopéptidos (CPP) tienen la habilidad de aumentar la absorción del calcio y otros minerales divalentes como el hierro, el zinc y el magnesio ya que tienen la capacidad de formar complejos solubles con éstos. La actividad biológica de estos péptidos se debe a que contienen en su estructura tres serinas fosfatadas (SerP) formando la estructura aniónica SerP-SerP-SerP-Glu-Glu (Kitts, 2006). La alta concentración de cargas negativas de los CPP en especial, la de los grupos fosfatos fijados a los residuos de serina, son los sitios potenciales para la unión de los minerales. Se ha visto que la mayoría de los péptidos fijadores de minerales son generados a partir de las caseínas pero también pueden ser producidos a partir de algunas proteínas del suero como la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina (Vegarud y col., 2000). Estos péptidos se encuentran encriptados en la proteína de la leche y deben ser liberados para ser bioactivos (Vasiljevic y Shah, 2008), siendo la fermentación de la leche con bacterias ácido lácticas proteolíticas y algunas bacterias probióticas, uno de los métodos para la obtención de secuencias peptídicas bioactivas (Figueroa-González, 2010; González-Olivares, 2011). Se han encontrado una gran cantidad de péptidos bioactivos en quesos y leches fermentadas, ya que durante la elaboración de estos productos, las bacterias ácido lácticas utilizadas como cultivos iniciadores, degradan las proteínas de la leche, debido a que cuentan con un sistema proteolítico. Este sistema consta de tres componentes principales: la proteinasa ligada a pared celular (CEP o PrtP), sistemas de transporte de oligopéptidos y aminoácidos y una gran cantidad de peptidasas, la gran mayoría de ellas,

situadas intracelularmente (Hayes y col., 2007).

Dos de los géneros bacterianos más utilizados para la generación de péptidos bioactivos durante el proceso de fermentación de la leche son *Lactobacillus helveticus* y *Lactococcus lactis*. Éste último es utilizado en la producción de diversos quesos y leches fermentadas. La mayoría de los trabajos de producción de péptidos bioactivos, a partir del sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas, se enfocan a la producción de péptidos antihipertensivos y existen pocos trabajos que estudian la generación de péptidos que presentan otro tipo de actividad, como la actividad fijadora de minerales. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de péptidos fijadores de calcio y hierro a partir de la fermentación con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712, bajo diferentes condiciones de pH. Se realizó la fermentación bajo dos condiciones de pH, una en la que se dejó evolucionar libremente el pH (fermentación sin control de pH) y otra manteniendo el pH a 6.2, valor reportado como óptimo para la proteinasa de pared celular (Kunji y col., 1996).

2 Materiales y métodos

2.1 Microorganismo

Se empleó la cepa *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 (Colección Nacional de Bacterias en Alimentos, Reino Unido), la cual fue conservada en medio litmus milk (DifcoTM, EUA) a 4°C. El inóculo fue crecido en leche descremada en polvo (Alpura, México) por 24 h a 30°C obteniendo una concentración final de 10^8 ufc/mL.

2.2 Fermentación

Se evaluaron dos condiciones de fermentación en función del pH: una manteniendo el pH a 6.2 (adicionando NaOH 10 N cada dos horas) y otra dejando que el pH disminuyera por efecto de los ácidos producidos por el microorganismo. La fermentación se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 1L con 600 mL de leche reconstituida al 20% (Figueroa-Hernández, 2007). La leche se pasteurizó a 121°C durante 5 minutos. El medio de fermentación fue inoculado al 5% (v/v). Las fermentaciones se llevaron a cabo a 30°C durante 28 h. Se tomaron muestras a las 0, 8, 16, 24 y 28 h. Se ajustó el pH de cada muestra a 9 (para solubilizar la caseína) y se centrifugaron a 25000xg por 30 min a 4°C (centrífuga Beckman J2-MI, EUA), los sobrenadantes obtenidos

se almacenaron a -20°C para realizar los análisis posteriores. Las fermentaciones fueron realizadas por duplicado y los análisis de los sobrenadantes por triplicado.

2.3 Determinación de calcio fijado

Para cuantificar la capacidad de fijación de calcio de los hidrolizados de las fermentaciones se empleó la técnica reportada por Brown y Rydqvist (1981) con ligeras modificaciones. Se mezclaron 2 mL de cloruro de calcio 5 mM con 1 mL de la muestra diluida (1:10) con solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M (pH 8). Se incubó la mezcla durante 30 min con agitación de 100 rpm a 22°C . Posteriormente se tomó una alícuota de $10\ \mu\text{L}$ y se le adicionó 1 mL del reactivo de calcio arsenazo III (Diagnostic Chemical Limited, Canadá), finalmente se midió la absorbancia a 650 nm (espectrofotómetro Shimadzu UV-160, Japón) y se cuantificó el calcio no fijado. El calcio total se determinó tomando $10\ \mu\text{L}$ de cloruro de calcio 5 mM y se le adicionó 1 mL del reactivo de calcio arsenazo III. Se elaboró una curva patrón de calcio ($0\text{-}100\ \mu\text{g mL}^{-1}$). El calcio fijado se determinó con la ecuación 1.

$$\text{Calcio Fijado} = C_0 - C_1 \quad (1)$$

donde:

- C_0 = Concentración de calcio total
- C_1 = Concentración de calcio no fijado

2.4 Determinación de hierro fijado

Para cuantificar la capacidad de fijación de hierro de los hidrolizados de las fermentaciones se usó la metodología reportada por Hwang y col. (2001) con modificaciones menores: se tomó 0.1 mL de muestra y se mezcló con 0.6 mL de agua desionizada, se adicionó 0.1 mL de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.2mM). Se incubó a temperatura ambiente por 30 s. Se adicionaron 0.2 mL de ferrozina 1 mM (Sigma-Aldrich, EUA). La mezcla de reacción se agitó y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 562 nm y se calculó la concentración de hierro no fijado. Para la determinación de hierro total se preparó un testigo con todos los reactivos utilizados con excepción de la muestra. El hierro fijado por los hidrolizados se determinó con la ecuación 2.

$$\% \text{ Hierro fijado} = [(C_0 - C_1)/C_0] \times 100 \quad (2)$$

donde:

- C_0 = Concentración de hierro total
- C_1 = Concentración de hierro no fijado

2.5 Determinación de proteína

La determinación de proteína se realizó por el método de Lowry (1951) con algunas modificaciones. Se mezclaron $100\ \mu\text{L}$ de la muestra con $100\ \mu\text{L}$ de buffer de fosfatos (0.1M), se le adicionó un 1ml de reactivo de Lowry, el cual fue previamente preparado con 49 mL de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 M, 0.5 mL de CuSO_4 al 1% y 0.5 mL de tartrato de sodio y potasio ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) al 1%. La solución fue incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se le adicionaron $100\ \mu\text{L}$ de reactivo de Folin (Hycel, México). La reacción nuevamente fue incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se leyó la absorbancia a 595 nm. Se elaboró una curva patrón de seroalbúmina bovina ($0\text{-}100\ \mu\text{g mL}^{-1}$).

2.6 Determinación de actividad proteolítica

Se determinó por el incremento de grupos amino libres (Adler, 1979). Se mezclaron 2 mL de buffer de fosfatos pH 8.2 con $250\ \mu\text{L}$ de muestra, posteriormente la mezcla fue agitada vigorosamente y se le adicionaron 2 mL de la solución de ácido trinitrobencensulfónico (TNBS) al 0.1% (Fluka, Buchs, Suiza). La mezcla de reacción fue agitada y se incubó a una temperatura de 50°C durante 60 minutos. Los tubos de reacción se mantuvieron aislados de la luz. Para detener la reacción se adicionaron 4 mL de HCl 0.1N. Se leyó la absorbancia a 340 nm. Se elaboró una curva patrón utilizando una solución de glicina 3mM con 1% de SDS.

2.7 Estimación del peso molecular de los péptidos generados

Se realizó una cromatografía de exclusión molecular para estimar el peso molecular de los péptidos generados durante las fermentaciones con un cromatografo (Lab Alliance, EUA) y un detector de arreglo de diodos UV-Visible (SpectraSystem UV6000 LP, EUA). La columna utilizada fue la BioSep SEC-S-2000 con un tamaño de 300×7.80 mm (Phenomenex®, EUA). Se utilizó un buffer de fosfatos (0.1M, pH 6.8) como fase móvil. El flujo de trabajo utilizado fue de $0.9\ \text{mL min}^{-1}$.

2.8 Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de análisis de varianza ($\alpha=0.05$) con el programa estadístico NCSS 2000 (Hintze, 2001) para determinar si existían diferencias significativas en el porcentaje de hierro fijado y la concentración de calcio fijado durante las fermentaciones. Se estimó la correlación existente entre la actividad proteolítica y la concentración de calcio fijado o el porcentaje de hierro fijado por los péptidos producidos durante las fermentaciones con el programa Office Excel 2007 (Microsoft, EUA).

3 Resultados y discusión

3.1 Producción de péptidos fijadores de calcio

Se llevaron a cabo fermentaciones con dos diferentes condiciones de pH con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712, a una de ellas se le controló el pH, al valor óptimo de la proteinasa ligada a pared celular (pH = 6.2) (Kunji y col., 1996), mientras que el pH en la fermentación sin control varió de 6.44 a 5.01 a las 28 h de fermentación (Fig. 1). Se evaluó el grado de fijación de calcio de los sobrenadantes obtenidos de las fermentaciones, y se observó un aumento en la concentración de calcio que puede ser fijado por las muestras de la fermentación con control de pH a partir de la octava hora de fermentación hasta las 24 h. Este mismo efecto se observó en la fermentación sin control de pH pero en menor proporción. Esto se corroboró al realizar el análisis estadístico encontrándose que la concentración de calcio fijado por los sobrenadantes de las fermentaciones es significativamente diferente a las 16, 24 y 28 h, siendo mayor la concentración de calcio fijado en la fermentación con control de pH. Las máximas concentraciones de calcio fijado fueron de 0.28 mmoles de Ca^{2+} mg^{-1} de proteína en la fermentación con control de pH y de 0.23 mmoles de Ca^{2+} mg^{-1} de proteína para la fermentación sin control de pH, ambos valores se alcanzaron a las 24 h de fermentación. Se ha visto que el grado de fijación de calcio al péptido se encuentra muy relacionada con el grado de fosforilación de la caseína de la que se obtuvo el péptido, selección de la enzima con la cual fueron obtenidos los fragmentos peptídicos y de las condiciones en las que se llevan a cabo los estudios de interacción péptido-mineral como: el pH, temperatura y fuerza iónica (Kitts, 2006).

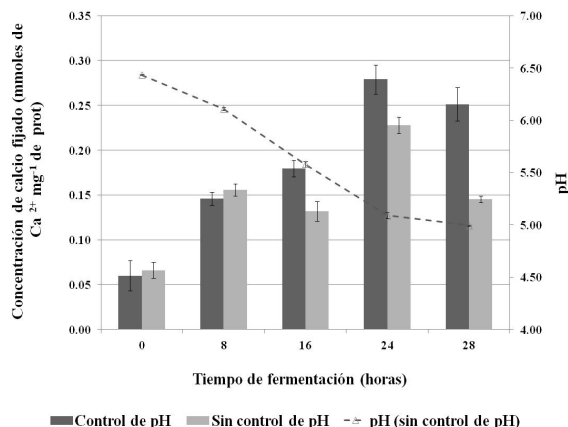


Fig. 1. Concentración de calcio fijado por los péptidos generados durante las fermentaciones realizadas con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 con y sin control del pH.

En un trabajo realizado por Kim y Lim (2004) donde se estudió el hidrolizado triptico de proteínas del suero de la leche, se encontró que se producen péptidos fijadores de calcio con pesos moleculares entre 3.4 y 1.4 kDa. Los péptidos pueden fijar entre 0.1 a 2 mmoles de Ca^{2+} mg^{-1} de proteína. Por lo que las concentraciones de calcio fijado encontradas en esta investigación con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 se encuentran dentro del intervalo de valores reportado por dichos autores.

Dimitrov (2009) realizó un estudio para determinar la capacidad fijadora de calcio de sobrenadantes ultrafiltrados de leches fermentadas con cepas de bacterias lácticas, encontrando cepas que presentaban fracciones peptídicas con mayor capacidad de fijación de calcio, entre las cepas que mostraron tener una mayor actividad se hallaban cepas de *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus casei*; la máxima concentración de calcio fijado por los sobrenadantes de *Lactococcus lactis* fue de 20.68 mmoles de Ca^{2+} mL^{-1} . Se calcularon los valores de calcio fijado en las fermentaciones realizadas con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712, los cuales van de 3.36 a 23.8 mmoles de Ca^{2+} mL^{-1} en la fermentación con control de pH y de 3.70 a 15.52 mmoles de Ca^{2+} mL^{-1} para la fermentación sin control de pH. Se observó que los valores máximos obtenidos de calcio fijado por los sobrenadantes de las fermentaciones con control de pH son muy similares al obtenido por la cepa de *Lactococcus lactis* reportada por Dimitrov (2009).

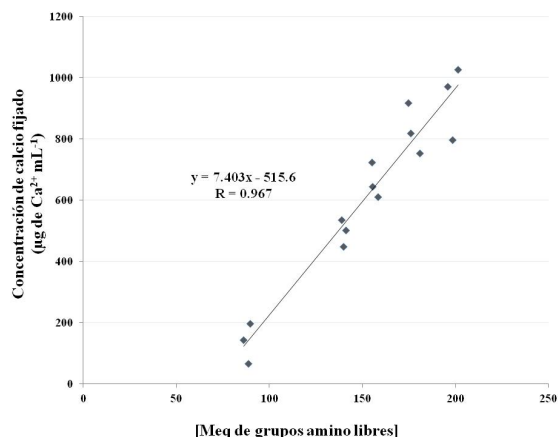


Fig. 2. Correlación de la actividad proteolítica con la concentración de calcio fijado por los péptidos generados durante la fermentación con control de pH realizada con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712.

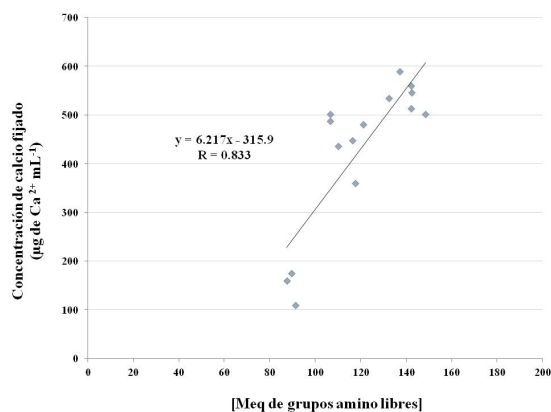


Fig. 3. Correlación de la actividad proteolítica con la concentración de calcio fijado por los péptidos generados durante la fermentación sin control de pH realizada con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712.

Se determinó la correlación entre el calcio fijado y la actividad proteolítica, debido a que se ha reportado que puede existir una correlación entre la actividad proteolítica y la actividad biológica de los péptidos (Pihlanto y col., 2010). Se encontró una correlación de 0.967 para la fermentación con control de pH (Fig. 2) y de 0.830 para la fermentación sin control de pH (Fig. 3). Esto nos indica que la producción de péptidos fijadores de calcio está relacionada con la actividad proteolítica de la proteinasa de pared celular de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712.

3.2 Producción de péptidos fijadores de hierro

Se determinó el grado de fijación del hierro de los sobrenadantes de las fermentaciones realizadas con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 (Fig. 4), y se observó que en las fermentaciones realizadas con control de pH se obtuvo un mayor porcentaje de hierro fijado que en las fermentaciones sin control de pH, lo cual se confirmó al realizar el análisis estadístico encontrándose que existen diferencias significativas entre ambas fermentaciones en la concentración de hierro fijado a las 8, 16 y 28 h.

En el inicio de la fermentación se observó un alto porcentaje de hierro fijado (30%), debido a que la leche contiene proteínas que tienen la capacidad de ligar hierro, como la α -lactoalbúmina, la β -lactoglobulina y la lactoferrina. Los porcentajes máximos de hierro fijado en las fermentaciones con control de pH y sin control son 60 y 38 % respectivamente.

Existen pocos trabajos acerca de la capacidad de fijación de hierro por péptidos generados durante la fermentación o hidrólisis enzimática de las proteínas de la leche. Farvin y col. (2010) demostraron que las fracciones peptídicas del yogurt tenían la capacidad de fijar hierro (7.7%), sin embargo utilizaron otra técnica para la determinación de hierro y la cantidad de proteína de los sobrenadantes utilizados era menor al encontrado en las fermentaciones realizadas en esta investigación con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712.

Liu y col. (2005) determinaron la capacidad fijadora de hierro de los sobrenadantes de las muestras obtenidas a diferentes tiempos durante la elaboración de kéfir con leche de vaca y soya cuyo contenido proteico era 10 mg mL⁻¹. En este estudio no se encontraron incrementos significativos en la actividad fijadora de hierro de las muestras de kéfir cuando son comparadas con las muestras sin fermentar (26%). Aunque no se puede comparar la actividad fijadora de hierro obtenido por los sobrenadantes del kéfir con los obtenidos por los sobrenadantes las fermentaciones de esta investigación con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 si se observa claramente que las fermentaciones con control de pH presentan una mejor actividad fijadora de hierro, lo cual no se observa en las fermentaciones realizadas sin control de pH.

Por otro lado, se encontró que en este caso no existe correlación entre la actividad proteolítica y el porcentaje de hierro fijado. Esto se debe a que la capacidad fijadora de las proteínas presentes,

observada desde el inicio de la fermentación, es más alta que la de los péptidos producidos (Fig. 4).

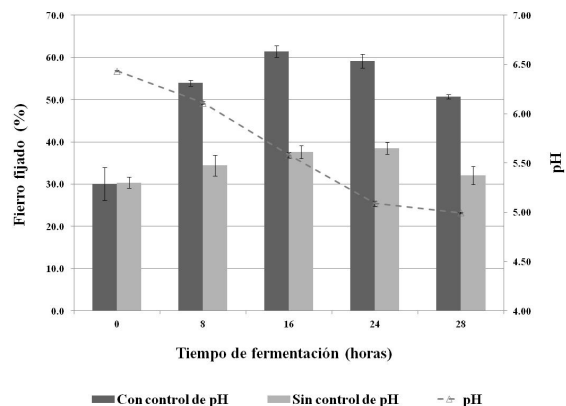


Fig. 4. Porcentaje de hierro fijado por los péptidos generados durante las fermentaciones realizadas con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 con y sin control de pH.

3.3 Comparación de los péptidos encontrados con péptidos fijadores de minerales reportados

Por medio de la cromatografía de exclusión molecular se estimó el peso molecular de los péptidos generados durante las fermentaciones realizadas con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712. En la Fig. 5 se observa el cromatograma del sobrenadante obtenido a la 28 h en ambas fermentaciones, en donde se pudo observar que los perfiles peptídicos de las fermentaciones realizadas mostraban diferencias sobre todo en la concentración de algunos de los péptidos producidos durante la fermentación, aunque también se observaron diferencias en los pesos moleculares de los péptidos generados en ambas fermentaciones. Los pesos moleculares de los péptidos producidos en las fermentaciones fueron comparados con péptidos fijadores de minerales reportados, encontrándose varias coincidencias (Tabla 1). En la Tabla 1 se hace una compilación de los reportes más relevantes al respecto y como se puede observar dentro de los fragmentos peptídicos

de las fermentaciones realizadas con control de pH, se encuentran dos fragmentos fijadores de minerales muy comúnmente producidos por medio de la hidrólisis enzimática con pepsina o tripsina a partir de la caseína, que son las secuencias β -CN(1-25) y α_{s1} -CN(59-79). Estos fragmentos contienen en su secuencia el triplete aniónico SerP-SerP-SerP, que se reporta como responsable de la unión de los minerales divalentes al péptido (Kitts, 2006). Sin embargo se ha visto que existen otros sitios potenciales para la fijación de los minerales dentro de la estructura de los péptidos, como los grupos carboxílicos libres del ácido glutámico y aspártico, pero su actividad es menor (Kitts, 2006).

Se debe mencionar que también existen secuencias peptídicas que coinciden con péptidos fijadores de minerales derivados de la proteínas del suero, los cuales han sido estudiados en los últimos años como fuentes de péptidos fijadores de minerales ya que también se ha visto que las proteínas del suero de la leche presentan sitios en donde se puede fijar el calcio, estos sitios se encuentran en la β -lactoglobulina (β -LG) y la α -lactoalbúmina (α -LA). En la α -LA existe un sitio que tiene una alta afinidad por el calcio, los aminoácidos en donde se fija este mineral son la asparagina y la lisina (Kim y Lim, 2004).

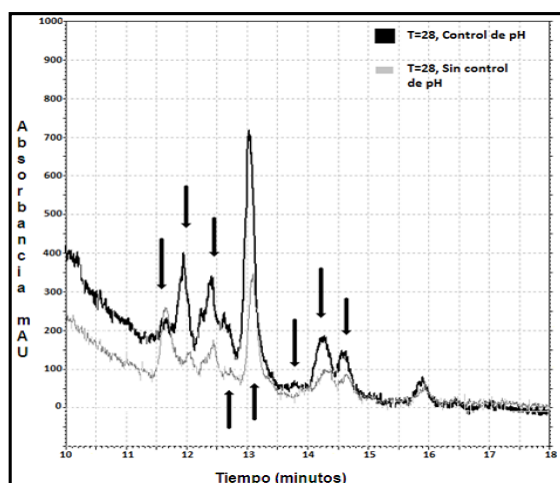


Fig. 5. Cromatogramas de exclusión molecular de los sobrenadantes de las fermentaciones realizadas con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 con y sin control de pH a las 28 horas, obtenidos a una longitud de onda de 215 nm.

Tabla 1. Comparación bibliográfica de los pesos moleculares de los péptidos generados durante las fermentaciones con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 que coinciden con péptidos acarreadores de calcio y hierro.

Control de pH				
PM experimental (kDa)	PM reportado (kDa)	Secuencia reportada	Capacidad de fijación de minerales reportada	Referencia
3.13	3.11	β -CN(1-25)-4P	4 mol de Fe^{2+} mol ⁻¹ de péptido, 2 mol de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} mol ⁻¹ de péptido (4.64 \pm 0.77 mol de Ca^{2+} mol ⁻¹ de péptido)	Meisel y Fitzgerald, (2003); Cross y col., (2005); Vegarud y col., (2000); Zidane y col., (2012)
2.79	2.71	α_{s1} -CN(59-79)-5P	6.84 \pm 0.45 mol Ca^{2+} mol ⁻¹ de péptido	Cross y col. (2001); Aimutis, (2004); Cross y col. (2005)
2.05	2.07	α_{s1} -CN(43-58)-2P	Ca^{2+} y Fe^{2+}	Vegarud y col. (2000)
1.06	1.01	β -CN(15-20)-4P	6.2 mmoles de Ca^{2+} mL ⁻¹	Dimitrov (2009)
0.71	0.67	β -LG(78-83)	0.4 mmoles de Ca^{2+} mg ⁻¹ de proteína	Kim y Lim (2004)
	0.69	α_{s2} -CN(29-34) ⁻¹ P	Ca^{2+}	Aimutis (2004)
Sin control de pH				
PM experimental (kDa)	PM reportado (kDa)	Secuencia reportada	Capacidad de fijación de minerales reportada	Referencia
2.02	2.07	α_{s1} -CN(43-58)-2P	Ca^{2+} y Fe^{2+}	Vegarud y col. (2000)
1.06	1.01	β -CN(15-20)-4P	6.2 mmoles de Ca^{2+} mL ⁻¹	Dimitrov (2009)
0.70	0.69	β -LG(78-83)	0.4 mmoles de Ca^{2+} mg ⁻¹ de proteína	Kim y Lim (2004)
	0.69	α_{s2} -CN(29-34) ⁻¹ P	Ca^{2+}	Aimutis (2004)

LG: Lactoglobulina, CN: Caseína

Conclusiones

En este trabajo se encontró que durante la fermentación con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 se generaron secuencias peptídicas que tienen la capacidad de fijar hierro y calcio. Con respecto a las fermentaciones efectuadas para evaluar la actividad fijadora de calcio se observó que en los sobrenadantes de las fermentaciones con control de pH se produjo un incremento en esta actividad. También se determinó que existe una correlación entre la actividad proteolítica y el calcio fijado encontrándose una mayor correlación con los sobrenadantes de las fermentaciones con control de pH. En cuanto a la actividad fijadora de hierro, se observó que en las fermentaciones con control de pH se incrementó la

actividad con respecto a las fermentaciones realizadas sin control, en las que se mantuvo la actividad propia de la leche. Los pesos moleculares de algunos péptidos producidos durante las fermentaciones con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712 coincidieron con algunas secuencias fijadoras de calcio y hierro reportadas.

Referencias

- Adler, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 27, 1256-1261.

- Aimutis, W. (2004). Bioactive peptides of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *Journal of Nutrition* 134, 989-995.
- Bouglé, D. y Bouhallab, S. (2006). Mineral-Binding proteins and peptides and bioavailability of trace elements. En: *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease*. Y. Mine y F Shadihi, eds., Pp. 29-40 Taylor y Francis. USA.
- Brown M. y Rydqvist, B. (1981). Arsenazo III- Ca^{2+} . Effect of pH, ionic strength and arsenazo III concentration on equilibrium binding evaluated with Ca^{2+} ion-sensitive electrodes and absorbance measurements. *Biophysical Journal* 36, 117-137.
- Cross, K., Huq, L., Palamara, J., Perich, J. y Reynolds, E. (2005). Physicochemical characterization of casein p'osphopeptide-amorphous calcium phosphate nanocomplexes. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 15362-15369.
- Cross, K., Huq, L., Bicknell, W. y Reynolds, E. (2001). Cation-dependent structural features of beta-casein-(1-25). *Biochemical Journal* 356, 277-286.
- Dimitrov, Z. (2009). Characterization of bioactive peptides with calcium-binding activity released by specially designed cheese starter. *Biotechnology & Biotechnology EQ*, 927-930.
- Farvin, K., Baron, C., Nielsen, N. y Jacobsen, C. (2010). Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 1-*in vitro* assays and evaluation in ω -3 enriched milk. *Food Chemistry* 123, 1081-1089.
- Figueroa-González, I., Henández-Sánchez, H., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz L., García-Garibay M. y Cruz-Guerrero A. (2010). Antimicrobial effect of *Lactobacillus casei* Shirota co-cultivated with *Escherichia coli* UAM0403. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 9,11-16.
- Figueroa-Hernández, C. (2007) Utilización del sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* para la generación de péptidos potencialmente bioactivos. Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
- González-Olivarez, L., Jiménez-Guzmán, J., Cruz-Guerrero, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L. y García-Garibay, M. (2011). Liberación de péptidos bioactivos por bacterias lácticas en leches fermentadas comerciales. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10,179-188
- Hayes, M., Ross, P., Fitzgerald, G. y Stanton, C. (2007). Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part I: Overview. *Biotechnology Journal* 2, 426-434.
- Heaney, R. (2000). Calcium, dairy products and osteoporosis. *Journal of the American College of Nutrition* 19, 83S-99S.
- Hintze, J. (2001). *NCSS Quick start & self-help manual*. Disponible en: www.ncss.com/pdf/manuals/quickstart.pdf. Accesado: 11 agosto 2011.
- Hwang, J., Shue, Y. y Chang, H. (2001). Antioxidant activity of roasted and defatted peanut kernels. *Food Research International* 34, 639-647.
- Kim, S. y Lim, J. (2004). Calcium-binding peptides derived from tryptic hydrolysates of cheese whey protein. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 17, 1459-1464.
- Kitts, D. (2006). Calcium binding Peptides. En: *Nutraceutical proteins and peptides in health and disease* (Y. Mine y F Shadihi, eds), Pp 65-78 Taylor y Francis. USA.
- Kunji, E., Mierau, I., Poolman, B., Konings, W., Venema, G. y Kok, J. (1996). The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70, 187-227.
- Liu, J., Chen, M. y Lin, C. (2005). Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soy milk- kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2467-2474.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. y Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Meisel, H. y Fitzgerald, R. (2003). Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design* 9, 1289-1295.

- Pihlanto, A., Virtanen, T. y Korhonen, H. (2010). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *International Dairy Journal* 20, 3-10.
- Vasiljevic, T. y Shah, N. (2008). Probiotics- from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal* 18, 714-728.
- Vegarud, G., Langsrud, T. y Svenning, C. (2000). Mineral-binding milk proteins and peptides; occurrence, biochemical and technological characteristics. *British Journal of Nutrition* 84, S91-S98.
- Zidane, F., Matéos, A., Cakir-Kiefer, C., Miclo, L. y Corbier, C. (2011). Binding of divalent metals ions to 1-25 β -caseinophosphopeptide: an isothermal titration calorimetry study. *Food Chemistry* 132, 391-398.