

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA**

Tesis

Determinación de actividad proteolítica en queso Cotija

Que para obtener el Título de

Químico de Alimentos

Presenta

Javier Alejandro Mijangos Rivas

México, D.F

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente: Profesora Zoila Nieto Villalobos

Vocal: Profesora Maria Elena Cañizo Suárez de García

Secretario: Profesora Judith Jiménez Guzmán

1er. Suplente: Profesora Amelia Maria de Guadalupe Farres Gonzalez Sarabia

2do. Suplente: Profesora Maricarmen Quirasco Baruch

Sitio en donde se desarrolló el tema: Departamento de Biotecnología, UAM Iztapalapa

Asesora: Dra. Judith Jiménez Guzmán

Supervisor técnico: Dr. José Mariano García Garibay

Sustentante: Javier Alejandro Mijangos Rivas

Agradecimientos

A mis asesores Dr. García Garibay y Dra. Judith Jiménez Guzmán por su tiempo, sus conocimientos, apoyo y guía sin la cual no hubiese sido posible la realización de esta tesis.

A mi amiga y compañera Lucía por su apoyo, consejo y amistad. Gracias lucifer.

A mis amigos y compañeros Sandra, Abel, Mariano, Isaac, Edna, Lucía que a lo largo de la carrera además de su amistad también pude tener una buena relación de trabajo armoniosa, cordial, de respeto, etc lo cual como ellos también deben saber no siempre es posible.

A mis familiares: a mi tío Perico por su ayuda, a m tío Pepe, a mi tía Diana por su cariño y apoyo.

A mi mami por su esfuerzo, cariño, ayuda, desvelos, apoyo, guía, compañía y todo lo que ha hecho por mí. Gracias por haber estado ahí siempre, gracias por ser mi mamá.

A la UNAM y concretamente a esta mi Facultad de Química por haberme otorgado el privilegio y honor de haber realizado mis estudios universitarios.

Dedicatorias

Para las personas que más quiero.

Desde luego la primera persona a quien le dedico esta tesis es a mi mamá por que si he llegado hasta aquí es gracias a ella. Ella también se merece un reconocimiento porque además de su apoyo también ha tenido la difícil labor de ser papá y mamá.

También le dedico la tesis a mi tía Diana, quien también me ha ayudado a lo largo de mi vida. Gracias B.J.

Indice

A Indice Temático

Página

| | |
|--|----|
| 1.0 Introducción | 1 |
| 1.1 Resumen..... | 2 |
| 2.0 Antecedentes | 3 |
| 2.1.- Leche..... | 3 |
| 2.2. Composición de la leche..... | 4 |
| 2.2.1 Lactosa y minerales | 5 |
| 2.2.2 Grasa | 6 |
| 2.2.3 Proteínas de la leche | 7 |
| 2.2.3.1 Caseínas | 7 |
| 2.2.3.2 Proteínas del suero | 9 |
| 2.2.3.3 Proteínas minoritarias..... | 11 |
| 2.2.3.4 Otras sustancias nitrogenadas..... | 11 |
| 2.3 Bioactividad..... | 12 |
| 2.3.1 Péptidos Bioactivos..... | 12 |
| 2.3.2 Bioactividades propuestas..... | 12 |
| 2.3.3 Origen de los péptidos bioactivos..... | 14 |
| 2.3.4 Métodos de obtención de péptidos bioactivos..... | 16 |
| 2.3.4.1 Enzimas digestivas..... | 16 |
| 2.3.4.2 Fermentación..... | 16 |
| 2.3.4.3 Mezcla de los anteriores | 17 |
| 2.4.Queso..... | 18 |
| 2.4.1 Definición General..... | 18 |
| 2.4.2 Proceso del Queso..... | 18 |
| 2.4.2.1 Coagulación ácida..... | 19 |
| 2.4.2.2 Coagulación Enzimática..... | 19 |
| 2.4.3 Maduración | 22 |
| 2.5. Queso Cotija..... | 25 |
| 2.5.1 Definición y características..... | 25 |
| 3.0 Objetivos..... | 27 |
| 4.0 Metodología | 28 |
| 4.1 Determinación de actividad proteolítica en solución..... | 29 |
| 4.1.1 Método de Lowry a λ 590 nm en celda plástica..... | 29 |
| 4.2 Electroforesis Nativa | 30 |
| 4.2.1 Zimogramas..... | 32 |
| 4.2.2 Determinación de actividad proteolítica de la alcalasa usando gel de electroforesis..... | 32 |
| 4.2.2.1 Por inmersión.. .. | 32 |
| 4.2.2.2 Por acoplamiento | 33 |

| | |
|---|----|
| 4.2.2.3 Con la caseína incluida | 34 |
| 4.3 Extracción de proteína de queso..... | 35 |
| 4.3.1 Extracción de las proteínas de la fracción ácida (proteínas del suero) | 35 |
| 4.3.1.1 Extracción de proteínas con fosfatos..... | 35 |
| 4.3.1.2 Extracción de proteína con Citratos | 35 |
| 4.3.2 Extracción de las proteínas de la fracción alcalina (proteínas asociadas a la caseína) | 36 |
| 5.0 Resultados y discusión: | 37 |
| 5.1 Selección de una enzima con actividad proteolítica | 37 |
| 5.2 Determinación de actividad proteolítica en gel. | 41 |
| 5.2.1 Método de inmersión (gel con alcalasa sumergido en caseína)..... | 41 |
| 5.2.2 Método de acoplamiento (gel con alcalasa y gel con caseína) | 42 |
| 5.2.3 Con la caseína incluida | 43 |
| 5.3 Determinación del método adecuado para extraer proteasas del queso | 45 |
| 5.3.1 Extracción de proteasas de queso Camembert con citratos..... | 45 |
| 5.3.2 Extracción de proteasas de queso Camembert con fosfatos | 46 |
| 5.3.3 Extracción de proteasas de queso Camembert con urea | 47 |
| 5.4 Determinación de actividad proteolítica en queso Cotija con diferentes grados de maduración. | 50 |
| 6.0 Conclusiones:..... | 56 |
| 7.0 Bibliografía:..... | 56 |

B Índice de Figuras y Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1 Composición promedio de la leche..... | 4 |
| Figura 1. Mapa de los péptidos bioactivos latentes | 15 |
| Figura 2. Hidrólisis de la k- caseína por la quimosina | 20 |
| Figura 3. Curva patrón de seroalbúmina | 32 |
| Figura 4. Actividad de papaína en solución de caseína durante 1 hora. | 37 |
| Figura 5. Actividad de alcalasa en solución de caseína durante 3 horas | 38 |
| Figura 6. Actividad de alcalasa en solución de caseína durante 30 minutos | 39 |
| Tabla 2. Desviación estándar V_0 alcalasa..... | 39 |
| Figura 7. Gel con alcalasa sumergido en una solución de caseína | 41 |
| Figura 8 Gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie | 42 |
| Figura 9 Determinación de act. por acoplamiento de dos geles | 43 |
| Figura 10. Determinación de act. de alcalasa con caseína incluida a diferentes tiempos | 44 |
| Figura 11 Fragmentos gel de electroforesis con extractos ac de citrato de queso Camembert incubados a diferentes t..... | 46 |

| | |
|--|----|
| Figura 12 Fragmentos gel de electroforesis con extractos ac de fosfatos de queso Camembert incubados a diferentes t ... | 47 |
| Figura 13. Determinación de actividad proteolítica en los extractos de urea de queso Camebert | 48 |
| Figura 14. . Fragmentos de gel de electroforesis con caseína al 0.1% con extractos alcalinos de urea de queso Cotija de poca maduración incubados a diferentes tiempos. | 50 |
| Figura 15 Fragmentos de gel de electroforesis con caseína al 0.1% con extractos alcalinos de queso Cotija muy maduro incubados a diferentes tiempos..... | 50 |
| Figura 16. Determinación de actividad proteolítica en los extractos de urea de queso Camebert, y queso Cotija..... | 51 |
| Figura 17 Determinación de actividad proteolítica en los extractos de urea de queso Camebert, y queso Cotija. | 52 |
| Figura 18 Determinación de actividad proteolítica en los extractos de urea de queso Camebert, y queso Cotija. | 53 |
| Tabla 3 Masas moleculares de proteasas en extractos de urea de queso Camembert y Cotija. Calculados apartir figura17..... | 53 |
| Figura 19. Determinación de actividad proteolítica en los extractos de urea de queso Camebert, y queso Cotija..... | 54 |
| Figura 20 Gel de acrilamida sin caseína que se corrió paralelamente con el gel caseína de las figuras 14, 15, 16 y 17. | 55 |
| Tabla 4 Masas moleculares de proteasas en extractos de urea de queso Camembert, Cotija y seroalbumina Calculadas a partir de la figura 20..... | 55 |

1.0 Introducción

Los péptidos bioactivos son cadenas de dos a algunas decenas de aminoácidos que se producen in vivo o in vitro a partir de algunas proteínas de la leche, tanto de origen humano o bovino y al liberarse actúan de diferentes maneras; los principales tipos son: opioides, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), acarreadores de minerales, inmunomoduladores, antimicrobianos, antitrombóticos, etc. Una fuente importante de péptidos bioactivos son las proteínas del suero de leche que pasan sin problemas por el estómago y llegan hasta el intestino para ser absorbidas. La activación de un péptido bioactivo latente en las proteínas de la leche a una completa actividad ocurre durante la digestión. Para su obtención in vitro se usan cuatro técnicas básicas: a) hidrólisis con enzimas digestivas de origen animal, b) fermentación de la leche por cultivos iniciadores, c) hidrólisis enzimática usando proteasas de origen vegetal o microbiano y d) combinación de los métodos anteriores. Los péptidos bioactivos han sido identificados en varias de las leches fermentadas y en quesos madurados.

Durante la maduración de los quesos se aprecian diferentes cambios en el color, olor, sabor y plasticidad como resultado de diferentes reacciones bioquímicas como la oxidación de grasas, pérdida de agua, proteólisis, etc en los componentes de la cuajada fresca. Se ha reportado que durante la maduración del queso Gouda se producen péptidos bioactivos como resultado de reacciones proteolíticas, cuyo tipo y concentración dependen del tiempo de maduración.

El queso Cotija puede clasificarse como un queso de pasta dura, prensada, madurada; se vende en piezas grandes (entre 15 y 30 kg). Es elaborado con leche cruda; gracias a esto es que presenta una microflora muy variada lo que permite se produzcan durante la maduración muchas y muy variadas proteasas que contribuyen a sus características distintivas. El gran número de proteasas que intervienen en la maduración podrían al mismo tiempo producir péptidos bioactivos; por lo que el

objetivo de éste trabajo fue montar una técnica mediante la cual se pueda determinar la actividad proteolítica del queso Cotija y el efecto que tiene el tiempo de maduración en dicha actividad.

1.1 Resumen

En la etapa inicial del trabajo experimental se probaron dos diferentes proteasas (papaína y alcalasa) para determinar cuál podía actuar mejor sobre la caseína (componente mayoritario del queso). Se determinó la actividad de papaína y la alcalasa en soluciones acuosas de caseína, demostrando que la más eficiente en las condiciones probadas fue la alcalasa. El siguiente paso fue buscar la forma de determinar actividad proteolítica en un gel (zimograma). Se probaron tres metodologías diferentes. En una se corrieron geles nativos de electroforesis y se les sumergió en una solución de caseína al 2%. Los geles se incubaron y posteriormente se tiñeron para evidenciar la actividad. Una segunda metodología consistió en correr una electroforesis nativa de las proteasas y preparar un gel con caseína al 2% , después de correr estos dos geles se empalmaron y se incubaron durante 4 horas para posteriormente teñir el gel con caseína para evidenciar si había habido alguna hidrólisis. El tercer método probado consistió en correr a las proteasas en un gel de electroforesis nativo con caseína al 2% y posteriormente incubarlo a 40°C para permitir la acción de la alcalasa y a 37°C para los extractos de queso. El gel se tiñó posteriormente para evidenciar la zona donde hubiera habido proteolisis.

Ni la primera ni la segunda metodologías dieron resultados que permitieran determinar la actividad, pues en ninguna de éstas dos se pudo observar zona blanca (zona libre de caseína producto de la hidrólisis de la misma); sólo en la tercera metodología, es decir, la que incluía tanto las proteasas como la caseína en el mismo gel, se pudieron apreciar zonas de hidrólisis.

Una vez que se tuvo esta metodología confiable, se buscó un método para extraer las proteasas del queso. Se tomó como control positivo al queso Camembert pues se sabe que posee una alta actividad proteolítica.

Se probaron tres métodos de extracción de proteína: dos ácidos (fosfatos y citratos) y uno alcalino (utilizando urea).

Únicamente en el extracto obtenido usando urea se logró la extracción de proteasas cuya actividad se evidenció cuando se obtuvieron zonas claras de hidrólisis; mientras que en los extractos de citrato y fosfato no mostraron actividad. Esto sugiere que las proteasas están asociadas a la matriz de caseína del queso, pues la caseína se hace soluble a pHs alcalinos lo que permite su extracción junto con las demás proteínas asociadas a ella.

Una vez que se estableció la metodología completa se hicieron extractos del queso Cotija con diferentes grados de maduración. En los únicos extractos en los que se encontró actividad fueron en los correspondientes al queso Cotija de mediana maduración, esto quizá se explique por factores como: aw, viabilidad de los microorganismos y actividad de las proteasas. Esto hace pensar que en un principio las proteasas producidas no eran suficientes o que a tiempos mayores de maduración estas pueden ser desactivadas por factores como pH, aw o la aparición de algunos metabolitos microbianos.

2.0 Antecedentes

2.1.- Leche

La leche considerada bajo un aspecto fisiológico, es la secreción de las glándulas mamarias de los mamíferos. Comúnmente y debido a que es la más explotada el nombre de leche se refiere al producto

procedente de la vaca; la leche derivada de otras especies va siempre seguida con la designación de la hembra productora: “ leche de cabra”, “ leche de oveja”, leche de burra”, etc.

La densidad de la leche es de 1.032 a 15 °C debido a sus componentes: 87.5% agua y 12.5% de sólido que comprende grasa, proteína, lactosa y minerales principalmente (Keating y Rodríguez Gaona 1999)

2.2. Composición de la leche

En la Tabla 1 se muestra los valores promedio de los constituyentes de la leche

Tabla 1 Composición promedio de la leche

| Componentes | Composición % |
|--|------------------|
| Componentes mayoritarios | |
| Materia grasa | 3.9 |
| Proteínas y sustancias nitrogenadas no protéicas | 3.4 |
| Carbohidratos | 5.0 |
| Sales minerales | 0.9 |
| Agua | 87.0 |
| Componentes minoritarios: | |
| Enzimas (lipasas, proteasas, reductasas, lactoperoxidasa, etc.) | |
| Vitaminas liposolubles: (D, E y K) e hidrosolubles(C y vit del grupo B) | |
| Pigmentos (caroteno, riboflavina, xantofila) | |
| Células diversas (células epiteliales, bacterias, levaduras y hongos) | |
| Otros compuestos (CO ₂ , O ₂ , N ₂ y otros gases) | |
| Sustancias extrañas | |

Basado en la Tabla No.20 de Scott (1991).

La composición de la leche no es constante, puede verse variada por factores tales como la especie, la raza, el ciclo de lactancia, edad de la vaca, época del año, el clima, sistema de cría, hora de ordeño y tipo de alimentación (Ortiz Chao Tesis 2004).

2.2.1 Lactosa y minerales

La fracción de carbohidratos de la leche está compuesta esencialmente por lactosa y algunos otros azúcares en pequeñas concentraciones, como la glucosa y la galactosa (0.1%).

La lactosa es un disacárido formado por α o β glucosa y β galactosa; dependiendo del tipo de glucosa que intervenga en la molécula, la lactosa puede encontrarse en dos formas isoméricas (α y β), las cuales se diferencian únicamente en la posición de un OH en un carbono de la glucosa (isomería ciclánica) y le otorga sus propiedades fisicoquímicas: solubilidad, cristalización, rotación de la luz polarizada, etc (Arenas Castañeda Tesis 2006; Flores Najera Tesis 2001 y Alais, 1970).

En la leche, están presentes los dos isómeros de la lactosa y la relación α : β está dada por el equilibrio; en general, la forma β es más soluble que la α , lo que desvía el equilibrio hacia la forma β : a 25°C el equilibrio es 1 α : 1.68 β .

La lactosa se encuentra en el queso entre 1 y 3% y juega un papel importante en los productos lácteos, ya que es el sustrato de fermentación para el desarrollo de las bacterias lácticas que la hidrolizan a glucosa y galactosa, para después metabolizarla y para la formación de ácido láctico, y por lo tanto interviene en la coagulación de la leche que se da por acidificación, e influyen también en la velocidad del desuerado y en la textura de la cuajada, y en el desarrollo de los microorganismos.

La leche tiene una gran variedad de sales, las cuales se encuentran en una proporción que varía de 3 a 10 g por litro de leche, son importantes para conservar la estabilidad del sistema. Los principales minerales presentes en la leche se encuentran en su mayoría en forma de sales solubles, como es el calcio, potasio, magnesio y sodio; estos se encuentran formando sales con los elementos ácidos: proteínas, ácido cítrico, fosfatos y cloruro.

En el caso de los fosfatos y citratos de calcio y magnesio, una parte importante se encuentra en forma coloidal asociados a las caseínas (Arenas Castañeda Tesis 2006; Flores Najera Tesis 2001).

Los minerales participan en la coagulación de la leche e influyen en el desuerado, y con ello en la textura del queso. La proporción de los minerales que quedan en el queso oscila entre 2.1 y 4.5% siendo los más importantes calcio, fósforo y hierro; estos elementos juegan un papel importante en la formación y en el mantenimiento de los huesos y dientes.

2.2.2 Grasa

La grasa de la leche está formada por la combinación física de triglicéridos, y éstos a su vez son el resultado de la reacción entre un alcohol (glicerol) y 3 ácidos grasos (en la leche existen alrededor de 400). De estos ácidos grasos la mayor parte son del tipo saturado; sin embargo, es el oleico insaturado el que existe en mayor cantidad (25%), y es la combinación de éste con el ácido linoléico (4%), el butírico (3.5%) y el caproico (2%) lo que influye en que sea bajo el punto de fusión de la grasa de la leche.

La materia grasa se encuentra en la leche en forma de pequeños glóbulos esféricos; posee dos fracciones protéicas, una de tipo de las glicoproteínas solubles en agua, y otras insolubles (Flores Najera 2001), que estabiliza el glóbulo de grasa. Su diámetro varía entre 2 y 10 μm , suspendidos en la fase acuosa del suero; envuelta en una membrana lipoprotéica, la cual está compuesta de lípidos, enzimas, glicoproteínas y trazas de diferentes elementos.

El contenido de materia grasa constituye la fuente a partir de la cual se forman algunos componentes que son los responsables en parte, de la textura, sabor, aroma, color y rendimiento del queso.

La influencia de la grasa en estas características depende, no sólo de la variedad de queso elaborado sino también de la composición y propiedades físicas de la leche, (cantidad de grasa y proteína), del proceso de coagulación y de la forma de trabajar a la cuajada, etc. La grasa por otro lado juega un papel importante ya que es la portadora de vitaminas liposolubles como la vitamina A y D, además aporta lecitina, que es una sustancia imprescindible para los tejidos nerviosos. El contenido de grasa en queso oscila entre 4 y 48 % (Arenas Castañeda Tesis 2006; Flores Najera Tesis 2001).

En la elaboración de quesos, durante la fase de coagulación de la leche, la incorporación de la grasa a la cuajada es importante, ya que la composición de esta grasa y de la membrana de los glóbulos juegan un papel importante en las características finales del queso. Por ejemplo, los glóbulos de grasa grandes salen con mayor facilidad de la cuajada durante la compresión y se eliminan también más fácilmente si el suero está a temperatura superior a los 25.6°C. Esta característica puede causar

problemas durante la maduración de los quesos, obteniendo un queso con poco contenido graso que tiende a secarse y endurecerse excesivamente. Cuando los quesos son frescos, tienen muy poco sabor y no dan lugar al típico aroma a queso (Arenas Castañeda Tesis 2006; Flores Najera Tesis 2001).

Durante la maduración de los quesos los ácidos grasos que se liberan pueden ser metabolizados y formar productos secundarios, originando componentes aromáticos tales como aldehídos, cetonas, alcoholes, etc; dando al producto final una consistencia agradable, y aroma y sabor a queso.

2.2.3 Proteínas de la leche

Las sustancias nitrogenadas (protéicas y no protéicas) constituyen la parte más compleja de la leche. Las sustancias no protéicas se encuentran en pequeñas cantidades (1.6 g/l), y tienen pesos moleculares menores a 500 Da, son dializables y permanecen en solución cuando las proteínas flocculan. Entre ellas se encuentran aminoácidos libres, urea, creatina, nucleótidos y vitaminas.

Las proteínas de la leche se clasifican en 2 diferentes grupos, en función de sus características fisicoquímicas y funcionales; estos grupos son: a) las caseínas, que precipitan a pH 4.6 (punto isoeléctrico); y b) las proteínas del suero, que son solubles a ese pH, a menos que hayan sido modificadas o desnaturalizadas por tratamiento térmico (Amiot 1991).

2.2.3.1 Caseínas

Las caseínas son las proteínas más abundantes de la leche, que constituyen aprox el 80% del contenido protéico total; por lo menos son un grupo de aproximadamente 20 proteínas fosforadas, siendo las principales: α_{s1} (40%), α_{s2} (11%) con peso molecular aproximado de 27 kDa, β (30%) de 24.2 kDa aprox y k-caseínas (11%) las cuales se denominan caseínas primarias. El resto de las caseínas se denominan caseínas derivadas, las cuales se originan a partir de la hidrólisis de las caseínas primarias por la acción de algunas proteasas propias de la leche. Estos polipéptidos incluyen a las γ – caseínas (γ^1 , γ^2 y γ^3) que se derivan de la caseína β , y a las caseínas λ que provienen de la hidrólisis de las caseínas α_{s1} y α_{s2} , por ello se les considera parte de las caseínas (García Garibay y col 2000; Ortiz Chao Tesis 2004 y Alais, 1970).

Todas las caseínas contienen grupos prostéticos formados por ésteres fosfóricos de la serina y en algunos casos de la treonina. La razón por la que estas proteínas presentan diferente sensibilidad hacia el ion Ca^{2+} , es que contienen un número diferente de grupos fosfatos en sus moléculas (Amiot 1991). Aquellas proteínas que contienen un gran número de residuos de fosfoserina, son las caseínas α_{s1} (8 o 9 P), α_{s2} (10 o 13 P) y β caseína (5 P) y tienden a unirse a cationes polivalentes, principalmente Ca^{2+} , lo que conlleva a la neutralización de sus cargas, y como se sabe, son las cargas las que mantienen a estas proteínas en suspensión, por lo que al neutralizarse precipitan.

La k- caseína contiene solamente un grupo fosfato, lo que la hace altamente estable frente al ion Ca^{2+} (sus variantes genéticas tienen 2 o 3), y es por esto que se encuentra en la parte exterior de la micela de caseína. La k- caseína es de suma importancia en las leches para quesería, ya que actúan como estabilizadora de la caseína α_{s1} , α_{s2} y β frente a la coagulación.

Las caseínas son anfóteras: presentan simultáneamente funciones ácidas y básicas. Al pH normal de la leche (6.6 -6.8), están del lado alcalino de su punto isoeléctrico y en consecuencia se comportan como ácidos. Las principales fuerzas de las que depende la estabilidad de las micelas de caseína son las cargas eléctricas y su grado de hidratación.

Las micelas de caseína se forman por la asociación de las caseínas de la leche con el calcio, los fosfatos y otras sales minerales para formar estructuras esféricas con un diámetro variable (entre 30 y 3000 nm), y son altamente porosas. Estas micelas de caseína están en equilibrio con la porción soluble de la leche y dependiendo del diámetro de estas micelas será más fácil o difícil su coagulación durante la elaboración del queso (Amiot 1991 y Alais,1970).

La k-caseína interactúa con las caseínas α_s y β a través de puentes de fosfato y citratos de calcio y magnesio, formando micelas termodinámicamente estables gracias a su naturaleza anfotérica (dada por casi todos los aminoácidos cargados más un residuo de carbohidrato en el extremo carbonilo terminal).

Las micelas de caseína están compuestas básicamente de proteínas (94%), y algunos iones y sales (6%); éstos son principalmente fosfatos de calcio, magnesio y citrato, y en conjunto se les denomina fosfato de calcio coloidal. En la leche, las micelas de caseína se encuentran altamente hidratadas, lo que ayuda a su solubilidad.

Se han sugerido una variedad de modelos de la estructura de la micela de caseína, el más probable consiste en subunidades de micelas unidas entre sí al azar, que se orientan a un interior hidrofóbico y una superficie hidrofílica (Amiot 1991).

Las subunidades aparentemente forman agregados mayores de micelas a través de puentes de fosfato de calcio coloidal. Aproximadamente el 70% de la k-caseína reside en la superficie de la micela, mientras que el 30% tiene una orientación hacia el interior.

Las k-caseínas en la superficie interactúan libremente con el solvente y previenen una agregación mayor de las caseínas α_{s1} , α_{s2} y β que se encuentran al interior de la micela y son altamente sensibles al Ca^{2+} .

Las propiedades fisicoquímicas de las micelas de la caseína juegan un papel importante en varios tratamientos tecnológicos, además de la elaboración de queso. Durante la maduración del queso, las caseínas α_s resultan hidrolizadas en unidades peptídicas inferiores, cada una de las cuales aportan un sabor característico dependiendo del aminoácido terminal; por ejemplo, la fenilalanina-fenilalanina-alanina-prolina aportan un sabor amargo al queso. Por otro lado, los diversos enlaces de las moléculas de caseínas α_s y las cadenas de β -caseína se hidrolizan con facilidad; si se produce una hidrólisis posterior de las mismas, se acumula una reserva disponible de nitrógeno no protéico que es un nutriente esencial para la actividad bacteriana y posible precursor de las sustancias responsables del sabor y aroma del queso.

2.2.3.2 Proteínas del suero

Las proteínas del suero comprenden aproximadamente 20% del total de las proteínas de la leche. Las albúminas y las globulinas de la leche son muy diferentes a las caseínas. Son emulsoides verdaderos en el sentido de que presentan una fuerte afinidad por el agua. Estas no son coaguladas por ácido y son resistentes a la acción de quimosina. Para coagular estas proteínas no basta con neutralizar sus cargas, es necesario disminuir su grado de hidratación, ya sea por calor o por medio de alcohol (Amiot 1991).

Parte de las proteínas del suero que quedan retenidas en la cuajada contribuyen al valor nutritivo del queso, y desempeñan un papel importante en el desarrollo del sabor y el aroma durante el proceso de maduración. La proporción de las proteínas totales oscila entre el 3 y 39 %.

Las proteínas séricas constan de por lo menos 8 fracciones diferentes, la β -lactoglobulina, la α -lactoalbúmina, la albúmina sérica bovina, las inmunoglobulinas, la lactoferrina, la proteosa-peptona y algunas enzimas propias de la leche.

La β -lactoglobulina (β -lg) representa cerca de la mitad de las proteínas del suero de la leche de vaca, y un 12% del total de proteínas de la leche.

El punto isoelectrico de la β -lg es de 5.2 y contiene 162 aminoácidos, y cinco radicales de cisteína por mol, de los que cuatro están implicados en enlaces disulfuro; un enlace disulfuro une el residuo 66 al 160 y el otro el 106 al 119. El grupo tiol libre se encuentra en el residuo 121 (Cys¹²¹) y su reactividad es dependiente del pH. Se ha reportado además que los residuos de lisina presentes en la proteína, así como los grupos tirosina y triptofano, exhiben una reactividad variable dependiente del ambiente en el que se encuentre la β -lg. Su peso molecular es de 18,000 Da pero en la literatura se da a veces el de 36,000 Da debido a que tiene una gran tendencia a formar polímeros compuestos por dos cadenas polipeptídicas iguales. Hay cuatro variantes genéticas de ésta proteína (A, B, C, D). Se caracteriza por su solubilidad en una solución diluida de sales neutras y por su baja solubilidad en agua pura. Se puede cristalizar dializando una solución salina diluida a su pH isoelectrico (Ortiz Chao 2004).

La albúmina sérica representa el 5% de las proteínas del suero. Es exactamente igual que la albúmina del suero sanguíneo. Es una proteína de peso molecular de 65,000 Da y su punto isoelectrico es de 4.7. Es especialmente rica en lisina y cistina y contiene ácido aspártico y alanina en posiciones terminales. Es muy soluble en agua y se puede cristalizar a partir de una solución concentrada de sulfato amónico.

A finales del siglo XIX, Von Behring observó que los sueros de animales que habían padecido difteria contenían sustancias que neutralizaban el efecto de la toxina diftérica. A estas sustancias, que se caracterizaban por ser termolábiles y no dializables, se les denominó anticuerpos, debido a su capacidad de reconocer a las toxinas bacterianas. Posteriormente Hebermans propone el término de

inmunoglobulinas para designar a todas las sustancias con capacidad de anticuerpo. Hoy se conocen cinco tipos de inmunoglobulinas: IgM, IgA, IgG, IgD e IgE, cada una de ellas con ciertas características distintas. Las inmunoglobulinas son glicoproteínas que están formadas por cadenas polipeptídicas agrupadas, dependiendo del tipo de inmunoglobulina, en una o varias unidades estructurales básicas (García-Cozar y col 2003).

La α -lactoalbúmina es el principal componente proteico del suero de la leche humana y tiene alto valor nutritivo, esto se debe a su composición aminoácida que parece ser muy parecida a los requerimientos del lactante. Además contiene seroalbúmina, que es sintetizada por el hígado y transportada a la leche por medio de receptores presentes en la glándula mamaria. Tanto la α -lactoalbúmina como la β -lactoglobulina tienen propiedades fisiológicas entre las que están efectos inmunoestimulantes. El posible rol de la α -lactoalbumina como agente antitumorígeno ha sido investigado (Shah 2000).

2.2.3.3 Proteínas minoritarias

Hay otras proteínas que se encuentran en la leche en pequeñas cantidades. Las proteínas de la superficie de los glóbulos grasos están constituidas por una euglobulina y también por la fosfatasa alcalina y la xantín-oxidasa. Además se han aislado en la leche, una mucoproteína, una lipoproteína y ferroproteínas la lactoferrina y la transferina (Amiot 1991).

2.2.3.4 Otras sustancias nitrogenadas

La precipitación de las proteínas de la leche por tratamiento térmico (95°C/ 30 minutos) conjuntamente con la acidificación a pH 4.6, deja en el filtrado sustancias nitrogenadas diversas.

La más importante de estas sustancias nitrogenadas son las proteosas y las peptonas. Son diversas cadenas de peso molecular inferior a 10,000 Da. La mayoría provienen de la hidrólisis de la β -caseína por la plasmina de la leche, generando por un lado las γ -caseínas, y por la otra estos fragmentos de bajo peso molecular muy solubles que quedan en el suero. Además se encuentran carbohidratos nitrogenados y ácido siálico en proporciones variables. La hidrólisis de las proteínas aumenta la

proporción de proteasas-peptonas, que son importantes en la industria quesera porque su acumulación en los quesos está asociada a la aparición de sabores amargos.

Si se trata el filtrado no protéico con ácido tricloroacético (TCA) al 12% para precipitar las proteasas-peptonas, la fracción nitrogenada soluble se compone de urea, ácido úrico, creatina, creatinina, amoníaco, aminoácidos libres, adenina y guanina (Amiot 1991).

2.3 Bioactividad

2.3.1 Péptidos Bioactivos

Los péptidos bioactivos son aquellos que se producen *in vivo* o *in vitro* a partir de las proteínas de la leche, ya sea de origen humano o bovino, y al liberarse actúan de diferentes maneras en el organismo humano (Silva y Malcata 2005)

2.3.2 Bioactividades propuestas

Los principales tipos son: péptidos opioides (aquellos que tienen similitudes farmacológicas al opio o morfina) y son derivados de las caseínas llamados casomorfina. Estos son liberados durante el movimiento gastrointestinal. Además hay péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) que tienen funciones antihipertensivas, péptidos acarreadores de minerales, péptidos inmunomoduladores, péptidos antimicrobianos, péptidos antitrombóticos y péptidos hipocolestémicos (Korhonen y Philanto 1998, 2003; Silva y Malcata 2005).

Péptidos derivados de la β y α - caseína y de α -lactoalbumina, condicionan los péptidos inmunomoduladores que estimulan la actividad fagocítica y modulan las funciones de los linfocitos. El péptido inmunoestimulador de la β -caseína (63-68) se sobrepone a la casomorfina (60-65/69), dándole a las β -casomorfina un potencial de doble rol en modular tanto el tracto GI como la

inmunidad o funciones fagocíticas. Además de los péptidos casein inmunomoduladores, la lactoferrina humana y bovina suprimen fuertemente *in vitro* la blastogénesis del linfocito estimulado por lecitina.

Algunos péptidos muestran actividad antihipertensiva, estos péptidos son llamados casoquininas, ya que inhiben la enzima de conversión angiotensina I que hidroliza a la inactiva angiotensina I a un octapéptido llamado angiotensina II, el cual es un potente vasoconstrictor e incrementa la presión sanguínea (Shah 2000; Clare y Swaisgood 2000).

Ha sido reportado que la actividad *in vitro* de péptidos inmunomoduladores resultantes de hidrolizados de α_1 - y β -caseína estimulan la actividad de un macrófago en contra de las células rojas de la sangre (Shah 2000). Los inmunopéptidos derivados de la caseína han mostrado estimular las actividades fagocíticas de la murina y macrófagos humanos, y de proteger contra la infección de *Klebsiella pneumoniae* en ratones (usando α -lactoalbumina). Es posible que los péptidos estimulen la proliferación y maduración de las células T y otras células asesinas para un gran número de bacterias (principalmente bacterias entéricas) en los recién nacidos. Se ha reportado la actividad antibacteriana de la isracidina, el fragmento 1-23 de la α_1 -caseína obtenido por acción de la quimosina, en contra de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. La inyección de isracidina en la ubre de la vaca y oveja dan protección contra la mastitis (Shah 2000).

Los caseinofosfopéptidos (CPPs en inglés) previenen la precipitación del fosfato de calcio e incrementan la concentración del calcio soluble tanto *in vitro* como en el intestino delgado de las ratas (Shah 2000; Clare y Swaisgood 2000).

La adición de CPPs a las pastas dentales y gomas de mascar ha sugerido la capacidad de efectos anticariogénicos y prevenir la pérdida del esmalte. Los CPPs son insípidos y se les puede usar como

aditivo anticariogénico. Un severo tratamiento térmico de la leche puede causar desfosforilación de los residuos fosforseril y quizá afectar la biodisponibilidad de los CPPs (Shah 2000).

Algunos de las casomorfina afectan el tránsito gastrointestinal prolongándolo, es decir, tienen propiedades antidiarréicas; cuando se les aplica por vía intravenosa inducen un efecto analgésico y sedativo por su acción en el sistema nervioso; por ejemplo la α -lactorfina muestran una actividad muy ligera que relaja los músculos y en cambio la β -lactorfina tiene un efecto contractor (Shah 2000).

El suero de leche bovina contiene proteínas ligadoras de metales, inmunoglobulinas, factores de crecimiento y hormonas. La mayoría de las funciones de las proteínas del suero se relacionan con los sistemas digestivo o inmune. Se han mostrado funciones inmunoestimuladoras en las proteínas del suero, también efectos anticarcinogénicos de las proteínas del suero en ratas y ratones. Propiedades antimicrobianas de la fracción de las proteínas del suero han sido bien establecidas, por ello la lactoperoxidasa, la lactoferrina y las inmunoglobulinas ya han sido comercializados por dichas propiedades (Shah 2000).

2.3.3 Origen de los péptidos bioactivos

Una fuente importante de péptidos bioactivos es el suero de leche que pasa sin problemas por el estómago y llegan hasta el intestino para ser digeridas. La división entre un péptido bioactivo latente en la leche a uno con completa actividad ocurre durante la digestión (Schanbacher y col 1997). El origen común tanto de los péptidos bioactivos latentes (los que necesitan ser modificados para mostrar bioactividad) y los nativos y las bioactividades latentes que sólo dependen de la proteólisis para alcanzar la actividad total, sugiere una interrelación entre las bioactividades en la leche, el estado mamario y la función gastrointestinal (GI). En la Figura 1 se muestra un mapa de algunas fracciones que corresponden a péptidos bioactivos.

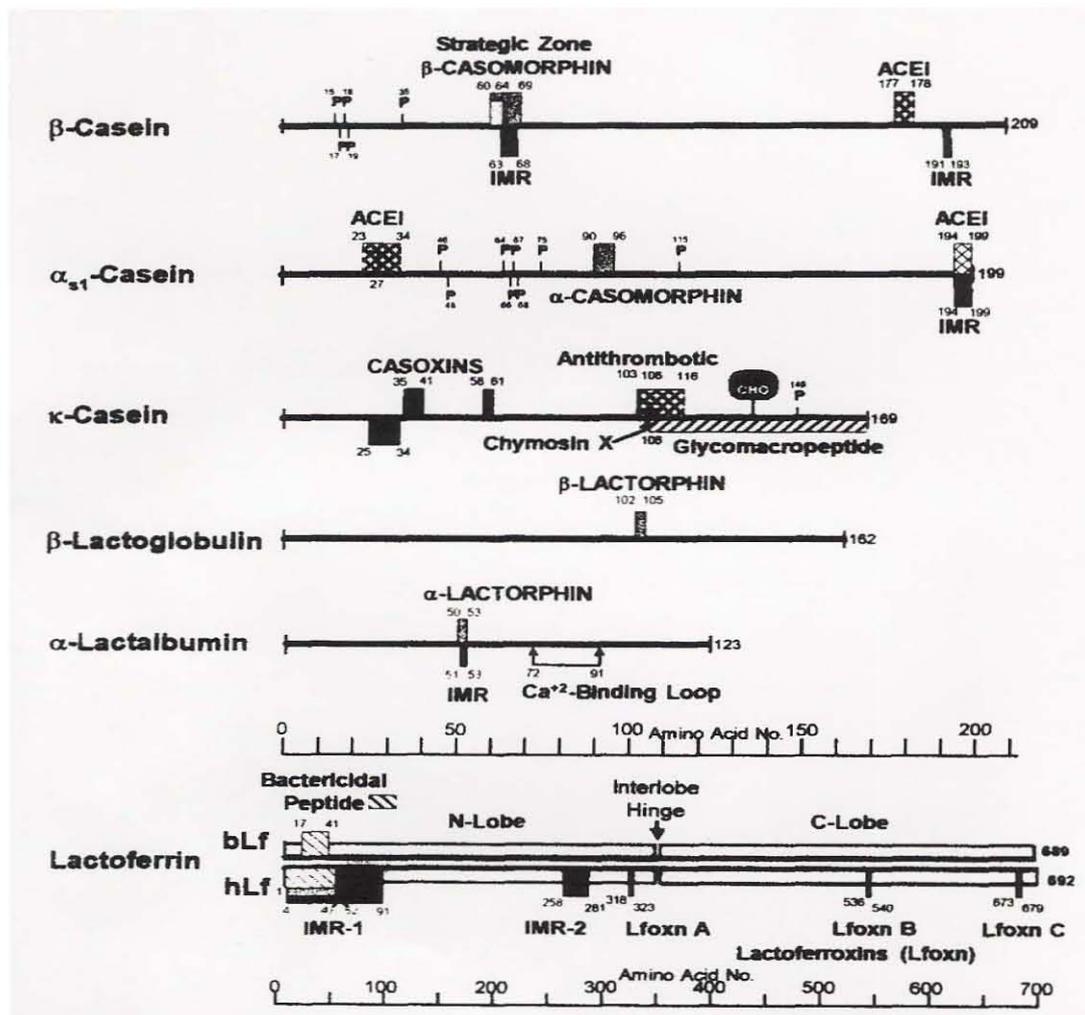


Figura 1. Mapa de los péptidos bioactivos latentes dentro de las secuencias lineales de las proteínas mayores. Los péptidos bioactivos dentro de la secuencia lineal de aminoácidos se indican por cajas extendiendo la posición de cada péptido. Múltiples tamaños para la misma bioactividad en la misma región se muestran dentro de una caja principal. Los números encima de las cajas indican el número de aminoácidos dentro de la secuencia de la proteína de origen para el comienzo (N-terminal) y al final (C-Terminal) de cada péptido. Los números al final de cada línea de las proteínas indican el número total de aminoácidos en esa proteína. Tipos similares de péptidos bioactivos están indicados por el mismo llenado de la caja expandiendo su posición dentro de cada secuencia de proteína, con la retención de ese esquema lleno en las proteínas. Para los péptidos bioactivos de la lactoferrina están indicados separadamente los bovinos (bLf) de los humanos (hLf). Diagrama tomado de Schanbacher y col 2005.

2.3.4 Métodos de obtención de péptidos bioactivos

Para la obtención de los péptidos bioactivos se usan cuatro técnicas básicas: a) hidrólisis con enzimas digestivas de origen mamífero, b) fermentación de la leche por cultivos iniciadores, c) hidrólisis enzimática con proteasas de origen vegetal o microbiano y d) sucesiva combinación de los anteriores. La formación y propiedades de péptidos así formados ha sido revisada en muchos artículos recientes (Korhonen y Pihlanto 2003).

2.3.4.1 Enzimas digestivas

Los péptidos bioactivos están encriptados (ver Fig 1) en su estado inactivo dentro de la cadena polipeptídica de las caseínas y otras proteínas. Estos péptidos son liberados en el organismo, ya sea a partir de caseínas (la caseína bovina consta de 4 componentes α_{s1} -, α_{s2} -, β - y k-caseína mientras que las humanas principalmente de β - y k-caseína) ingeridas por su posterior hidrólisis por nuestras enzimas o por su ingestión como tales.

2.3.4.2 Fermentación

Las proteasas son enzimas que hidrolizan las proteínas en péptidos más simples o en último término en aminoácidos. Se les puede llamar también peptidasas. La lisozima, cuya presencia se ha señalado en la leche, es una mucoproteasa que puede clasificarse como una enzima proteolítica.

Se ha comprobado que la leche contiene una pequeña cantidad de una proteasa nativa llamada plasmina. Su actividad proteolítica es máxima a pH 8 y 37°C. Esta enzima es muy termoestable y no se destruye en los procedimientos UHT. Su inactivación requiere un tratamiento de 142°C durante 16 segundos. Esta proteasa actúa preferentemente hidrolizando las caseínas α y β .

Mucho más importante que ésta proteasa nativa son las proteasas secretadas por los microorganismos. En la elaboración de diferentes productos lácteos, se utilizan en ocasiones proteasas exógenas. Algunas como la alcalasa, quimotripsina, pancreatina y pepsina así como enzimas de origen bacteriano y fúngico han sido aplicadas para la obtención de péptidos bioactivos a partir de diversas fuentes de proteína (Korhonen y Pihlanto 2003). Durante una fermentación controlada con cultivos iniciadores, péptidos con varias bioactividades pueden formarse y se les ha detectado en leches fermentadas y quesos.

Una gran variedad de péptidos son generados durante la maduración de los quesos, muchos de los cuáles presentan bioactividades. CPPs han sido encontrados como constituyentes naturales en los quesos Comte y Cheddar (Korhonen y Pihlanto 2003). Aún más, una proteólisis secundaria durante la maduración de los quesos puede guiar a la formación de otros péptidos bioactivos y el grado de bioactividad parece estar relacionado con la etapa de maduración de los quesos.

2.3.4.3 Mezcla de los anteriores

En el futuro, éstos péptidos podrán ser producidos también en forma industrial en forma de hidrolizados o mezclas de péptidos que pueden ser utilizados como ingredientes de productos alimenticios o farmacéuticos. Es por ello que cada vez es más frecuente su uso y comercialización. Gracias a un aumento en el interés que tienen los ingredientes de los alimentos en el mejoramiento de la salud, muchas han sido las publicaciones para cubrir los recientes avances sobre éstos péptidos, por ejemplo los fosfopéptidos derivados de las fracciones de la caseína se están usando tanto para suplementos alimenticios como farmacéuticos (Korhonen y Pihlanto 2003).

Se están desarrollando técnicas viables para poder comercializar a nivel industrial los péptidos bioactivos. Estas tecnologías se basan en separación por membrana y cromatografía de intercambio iónico y se busca aplicarla en la industria emergente de ingredientes de productos alimenticios.

Hasta ahora las técnicas de separación por membrana han demostrado ser la mejor tecnología disponible para la concentración de péptidos con un rango específico de peso molecular (Korhonen y Pihlanto 2003). La ultrafiltración es rutinariamente utilizada para enriquecer péptidos bioactivos de hidrolizados de proteína.

La extracción continua de péptidos bioactivos en reactores acoplados con membrana de ultrafiltración ha sido principalmente aplicada en proteínas de la leche. Bouhallab y Touze´ en 1995 emplearon ésta técnica para recuperar péptidos antitrombóticos derivados de hidrolizado de caseinomacropéptido (CMP) (Korhonen y Pihlato 2003).

Además estos péptidos pueden mejorar la seguridad del alimento por sus propiedades antimicrobianas; también se les puede ver como productos para la salud pues tienen valor terapéutico como preventivos o curativos de enfermedades.

2.4.Queso

2.4.1 Definición General

El queso puede ser definido como el producto resultante de la concentración de una parte de la materia seca de la leche, por medio de una coagulación enzimática de ésta con la subsecuente separación del suero. El queso es por tanto un concentrado de submicelas de caseína que da origen a la estructura tridimensional, en la que quedan retenidos el agua, la materia grasa, las sales minerales y otras sustancias de bajo peso molecular. La concentración de estos componentes varía en función de la calidad y tipo de leche utilizada, del tipo de queso y el proceso de fabricación (García Garibay y col 2000).

Existen alrededor de 1000 variedades de quesos en el mundo; solamente en Francia hay más de 200 (García Garibay y col 2000).

2.4.2 Proceso del Queso

Se pueden distinguir cinco operaciones fundamentales comunes a la fabricación de quesos: la preparación de la leche, la coagulación, el desuerado, el salado y la maduración (García Garibay y col 2000). En la presente tesis se omitirán algunos pasos, pues el objetivo no es describir la fabricación

del queso, sino determinar el efecto del tiempo de maduración del queso Cotija sobre la actividad proteolítica en el mismo mediante el montaje de una técnica (zimograma).

La coagulación de la leche destinada a la elaboración de queso se lleva a cabo por dos procesos: por coagulación ácida y por coagulación enzimática.

2.4.2.1 Coagulación ácida

La coagulación de la leche por acidificación causa la desestabilización de las micelas, como consecuencia de la disminución de las cargas de los grupos ácidos de las caseínas, al alcanzar su punto isoelectrico (pH=4.6).

Al mismo tiempo la acidez del medio aumenta la solubilidad de los minerales, y el calcio y fósforo orgánicos que contienen las micelas pasan gradualmente hacia la solución de la fase acuosa, por lo tanto la cuajada ácida está parcialmente desmineralizada, lo que facilita la expulsión del suero (García Garibay y col 2000).

La coagulación depende además del pH, de la temperatura y del contenido en sales (principalmente calcio). Este proceso de coagulación se utiliza en la elaboración de quesos frescos como el Cottage, y en quesos procesados fundidos o tipo americano.

2.4.2.2 Coagulación Enzimática.

En la industria quesera el método más utilizado para la elaboración de queso es la coagulación enzimática de la leche. La coagulación de la leche puede ser llevada a cabo por enzimas proteolíticas de origen bacteriano, fúngico, vegetal, o animal. De éstas son muy pocas las utilizadas y compatibles con la tecnología quesera.

En cuanto a las enzimas de origen animal, el cuajo natural (una enzima proteolítica secretada en el abomaso de terneros), es el agente coagulante usado tradicionalmente. Este cuajo está constituido principalmente por la proteasa ácida quimosina y en menor proporción por la pepsina. Otras proteasas utilizadas son las pepsinas bovinas y porcinas, y las de origen fúngico (cuajos microbianos) las de *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus* o *Mucor miehei* (García Garibay y col 1993).

Para la elaboración de quesos la utilización de la enzima quimosina es la mejor opción, mientras que la pepsina la peor pues hidroliza de manera no específica por lo que no quedan caseínas que coagular.

La coagulación enzimática se divide en dos fases importantes: una fase propiamente enzimática o primaria, y una fase de agregación o secundaria.

La fase primaria que corresponde a la proteólisis de la k-caseína se ilustra en la Figura 2.

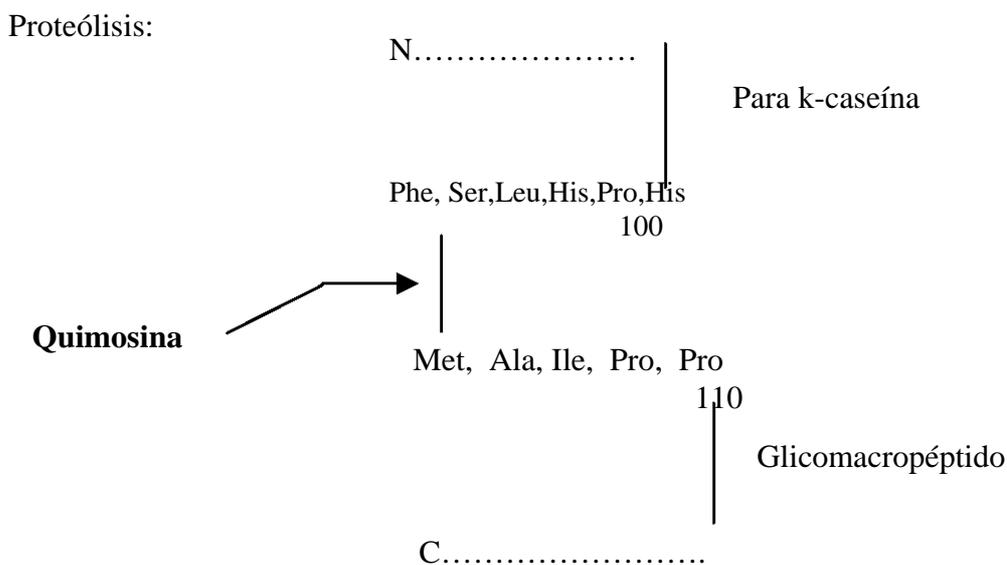


Figura 2. Hidrólisis de la k- caseína por la quimosina

La fase de agregación o secundaria consiste en la formación de un gel resultante de la desestabilización de las micelas. Esta fase se inicia cuando el nivel de hidrólisis de la k- caseína alcanza entre el 80 y 90% (grado mínimo de hidrólisis requerido). La fase de agregación depende de la temperatura de reacción y de de la presencia de iones de calcio en el medio, para llevarse a cabo.

Factores que influyen en la coagulación de la leche. En la industria quesera es común el uso de cultivos lácticos que además de provocar la coagulación del queso le da a éste ciertas características como las de los quesos Camembert, Cheddar, etc.

Debido a su naturaleza química, a las enzimas les afectan los mismos factores que alteran a las proteínas; por esta razón, cada una de ellas para actuar en forma óptima requiere de ciertas condiciones específicas como la temperatura, el pH, concentración iónica (ion calcio y fosfatos), etc.

La reducción del pH por debajo del normal de la leche (pH 6.6), trae una aceleración de la actividad enzimática (el pH óptimo de la quimosina sobre la caseína es de 5.5). La acidificación favorece además la neutralización de las cargas y a la solubilización del calcio acelerando así la aglomeración de las micelas de caseína.

La concentración iónica es otro de los factores que intervienen en el proceso de coagulación. La presencia de calcio en la leche permite la formación de una red tridimensional de las caseínas, mejorando el proceso de desuerado y facilitando la retención de la grasa. Durante la etapa de coagulación la concentración iónica afecta principalmente a la fase secundaria: cuando la concentración de calcio es baja la coagulación es lenta y con ello dando origen a una cuajada porosa, friable y poco contráctil, etc.

El proceso de escurrimiento incluye dos operaciones importantes, la sinéresis del coágulo y la expulsión del lactosuero. La sinéresis ayuda a la concentración del coágulo por la eliminación del suero de la red proteica.

Para acelerar y controlar el proceso de escurrimiento es necesario implementar tratamientos térmicos y mecánicos. El aumento en la temperatura acelera el escurrimiento de una manera marcada. Esta se sitúa entre 20 y 55°C dependiendo del pH humedad deseados al final del escurrimiento. Para el caso de coágulos cocidos y prensados, donde se busca pH alto y extracto seco, se realiza un cocimiento severo del coágulo (25 a 50 min a 52-55°C) el cocimiento afecta la textura del queso (García Garibay y col 2000).

El principal objetivo del prensado consiste en transformar a las partículas de cuajada que contienen altas cantidades de agua (suero), grasa, y proteína, en una masa compacta que facilite su manejo y eliminando en el proceso el suero débilmente retenido en las proteínas de la cuajada. Para llevar a cabo la deshidratación de la cuajada se utilizan mecanismos de presión mecánicos, neumáticos o bien hidráulicos.

El proceso de salado es fundamental en la fabricación de queso, el cual permite completar la expulsión del suero, es decir, la eliminación del agua libre al modificar el nivel de hidratación de las proteínas. La función más importante del salado es controlar la fase de maduración actuando como un agente de conservación selectivo y dar sabor al queso (García Garibay y col 2000).

El salado se puede realizar por aplicación directa de sal en seco, inmersión en salmuera ó aplicación de sal sobre la superficie del queso. Durante el proceso de salado los factores importantes a considerar son: la temperatura, el tiempo de salado y pH.

2.4.3 Maduración

La mayoría de los quesos pasan por un periodo de maduración o afinado durante el cual se desarrolla su sabor, aroma y cuerpo. El queso, que al principio es casi blanco, se vuelve poco a poco más amarillo y la consistencia va cambiando; en unos va siendo cada vez más blanda, mientras que en otros queda cada vez más dura. El olor se desarrolla y el sabor, que al comienzo es ligeramente ácido, se va acentuando y queda más o menos fuerte y por otro lado, la masa que al principio es elástica, algo grasosa y poco soluble, va volviéndose más soluble y gana plasticidad. Los agentes responsables por los cambios que se dan durante la maduración son principalmente enzimas de diferentes fuentes, tales como los microorganismos naturales presentes en la leche, o bien de los cultivos iniciadores y de algún otro tipo que se desarrollan en el interior y superficie del queso (Keating y Rodríguez Gaona 1999).

Durante la maduración, los quesos sufren modificaciones físicas y químicas de sus componentes (materia grasa, proteínas, lactosa, etc) en productos más solubles. Una causa de estos cambios, además de la presencia de las enzimas liberadas por autólisis de las células bacterianas, puede ser una alteración en el metabolismo de los microorganismos que crecen dentro o en la superficie del queso, lo que se refleja en el desarrollo de sabores y características físicas.

Los procesos metabólicos básicos que se llevan acabo durante la maduración son: la glucólisis, lipólisis y proteólisis.

En la maduración, la mayoría de la lactosa desaparece de los quesos de pasta dura dentro de los primeros días de la maduración. La fermentación de la lactosa por las bacterias lácticas produce principalmente ácido láctico y algunos ácidos volátiles, etanol y pequeñas cantidades de otros subproductos.

La mayor parte de los compuestos nitrogenados en el queso se presenta como proteínas insolubles, sin embargo, conforme la maduración avanza, estos compuestos se hidrolizan por acción enzimática a compuestos más simples y solubles.

El grado de proteólisis y la formación de compuestos resultantes ayuda a establecer las características del queso madurado. Por ejemplo, los quesos de pasta dura como el Cheddar, sufren una proteólisis muy ligera, únicamente 25-35% de la proteína se vuelve soluble; en cambio, en un queso madurado como el Camembert, una alta proporción del rompimiento produce péptidos y aminoácidos (Amiot 1991).

A su vez, los microorganismos durante su desarrollo pueden actuar por medio de las exoenzimas proteolíticas y descomponer la caseína, después de la autólisis de las bacterias (muerte), las endoenzimas liberadas (polipeptidasas) pueden desdoblar los productos nitrogenados intermedios, liberados por el cuajo o por los microorganismos, para liberar los aminoácidos histidina, tirosina y lisina.

La acción proteolítica del cuajo es favorecida por la reacción ácida del medio (pH 5 a 5.5) y tanto el *Lactococcus lactis subsp. lactis* como el *Lactococcus lactis subsp. cremoris* parecen favorecer la proteólisis por el cuajo, pero según parece, el primero es el más favorable, puesto que el cuajo en presencia del *Lactococcus lactis subsp. lactis* producirá 91% de liberación de péptidos mientras que con el *Lactococcus lactis subsp. cremoris* producirá 70%. En ciertos quesos blandos la degradación de la proteína y la formación del aroma son derivados especialmente de la acción de las exoenzimas de su variada flora superficial (Munster, Limburger, Camembert) (Keating y Rodríguez Gaona 1999).

En determinados quesos semiduros la flora superficial parece no tener una acción proteolítica extensa y directa, pero puede favorecer la formación del aroma característico (Keating y Rodríguez Gaona 1999).

Esta flora superficial puede ser bastante resistente a la sal y exige alta humedad en el medio ambiente para crecer, mientras que el desarrollo de las diversas especies sigue una secuencia regular en que los varios agentes microbianos van preparando el medio para la especie siguiente de la secuencia.

Al comienzo como en el caso del queso Port Salat, se desarrollan en la superficie del queso levaduras y algunos hongos, especialmente la *Oospora lactis* (*Geotrichum candidum*). Estos microorganismos forman vitaminas, ac. pantoténico y consumen el ácido láctico, haciendo ascender el pH hasta el punto conveniente para el desarrollo de las bacterias tolerantes a la sal (NaCl). El queso se presenta cubierto de una capa blanca de limo viscoso. Después, poco a poco, este limo se vuelve ligeramente anaranjado o rojizo, debido al desarrollo del *Brevibacterium linens* y del *Brevibacterium erythrogenes* (Keating y Rodríguez Gaona 1999).

El *Brevibacterium linens* es un bacilo gram-positivo muy proteolítico que ataca la caseína, formando aminoácidos, amonio, y tiene el pH óptimo de 5.8.

Frecuentemente, y en algunos tipos de quesos, antes del desarrollo del *Brevibacterium linens* se desarrollan en la superficie algunas especies de micrococos: *Micrococcus varians*, *Micrococcus frendereichi* y *Micrococcus caseolyticus*, que forman alcohol y ácidos grasos volátiles (Keating y Rodríguez Gaona 1999).

En el queso Camembert, queso de cuajada mixta (ácida y enzimática), la flora superficial empieza por el desarrollo de algunas levaduras, seguidas del crecimiento sucesivo del *Geotrichum candidum* y del *Penicillium camemberti* (*P. caseicolum*) y del *Brevibacterium linens* (Keating y Rodríguez Gaona 1999).

Su fabricación tradicional comprende utilizar leche estandarizada acidificada con un cultivo mesófilo; el desuerado espontáneo de la cuajada sin cortar en los moldes y la acidificación durante el desuerado con la consiguiente desmineralización de la cuajada, contribuyen a las características texturales típicas de este queso.

La extensión y la acción final del desarrollo de esta flora superficial varía según el tipo del queso; en los quesos Chanco, Brick, etc., parece contribuir apenas para la formación del sabor sin gran acción proteolítica, tal vez porque, a pesar de que el pH de la superficie del queso permite el crecimiento del *B. linens* (pH óptimo 5.8), la enzima (proteasa) producida por el microorganismo tiene su pH óptimo al valor de 7 y trabaja a la mitad de su actividad a un pH de 6.5 y de 8.0, pero en otras variedades de queso la flora superficial contribuye en forma específica en los cambios de la maduración (queso Limburger, Camembert) que actúan como estimulantes para el desarrollo del *B. linens* (Keating y Rodríguez Gaona 1999).

Los quesos de pasta cocida, principalmente los de tipo Gruyere y Emmental, tienen agujeros u ojos que se deben al gas producido por las bacterias propiónicas anaerobias. Esta fermentación se obtiene sembrando la leche con un cultivo de *Propionibacterium shermanii*

Muchas otras especies bacterianas participan directa o indirectamente en la maduración de los quesos por su alta actividad hidrolítica, produciendo sustancias aromáticas, asociándose con otras fermentaciones. Este es el caso de los micrococos, que tienen actividad proteolítica, son halotolerantes y actúan en simbiosis con otros microorganismos. El papel de *Brevibacterium linens*, tiene especial importancia en la fermentación aeróbica de las proteínas de algunos quesos. Estas bacterias tienen la propiedad de producir una degradación proteica muy acusada.

En realidad, en éste último caso la diferencia entre el pH alto junto a la costra y el pH bajo en el centro indican perfectamente la intervención de una maduración extra en el queso (según Fleischman la maduración se puede dividir en dos fases principales: la premaduración y la maduración verdadera). En estas variedades de queso, la masa ácida y friable empieza a quedar blanda y suave del exterior hacia el interior (Keating y Rodríguez Gaona 1999).

2.5. Queso Cotija

2.5.1 Definición y características

El consumo de queso mexicano es una de las que más crecimiento han tenido en los Estados Unidos; tan sólo de 1996 a 2001 la producción para satisfacer esa demanda pasó de 67.4 millones de lb a 102.6 millones de lb, es decir 51%; entre ellos el queso tipo Cotija.

El queso Cotija, es un queso muy original, la producción artesanal de queso Cotija data de hace 400 años. Cabe señalar que el 30 de noviembre de 2005, el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial entregó la Marca Colectiva Región de Origen al Queso Cotija, en un acto realizado en Cotija de la Paz al que asistieron los gobernadores de Michoacán, Lázaro Cárdenas Batel y de Jalisco, Francisco Javier Ramírez Acuña (Periodico La Jornada 2006).

Desde hace varios siglos en la serranía de Jalmich, que comparten los estados de Jalisco (municipios de Quitupan, Santa María del Oro y Jilotlán) y Michoacán (Tocumbo, Peribán, Cotija y Los Reyes) las familias elaboran el queso Cotija (Investigación y Desarrollo 2002).

Este queso no tiene la denominación de origen, sin embargo, la Marca Colectiva es un signo distintivo que indica que fue elaborado por un grupo específico de productores bajo un proceso de ordeña y elaboración artesanal determinada que garantiza a los consumidores la autenticidad y calidad del producto.

El queso Cotija contiene aprox. 35-42% de humedad, 23-30% de grasa, 28-31% de proteína y una concentración mayor a 4% de sal. Por sus características se le considera como el Parmesano Hispano (Santos Moreno y Villegas de Gante 1997). Al pertenecer al grupo de los quesos de pasta dura su maduración se desarrolla lentamente y en el interior de la masa. Estos quesos se conservan fácilmente y se pueden almacenar durante mucho tiempo, por lo que no representan problemas de comercialización.

El queso Cotija es probablemente después del queso panela, que se produce en varios estados del país, el queso mexicano genuino más conocido. Presenta una forma cilíndrica, y posee una pasta friable (desmoronable, adecuada para rayar), ácida (pH = 4.7-5.5) y con un elevado porcentaje de sal.

Ahora bien, aunque a detalle existen diversas secuencias de elaboración de este queso, según el estado, la región o el propio quesero, abstrayendo varios procesos se pueden arribar a una marcha general de elaboración que comprende los siguientes pasos: recepción de leche, estandarización, fijación de temperatura, cuajado, cortado o quebrado, reposo, desuerado, manteado, desmenuzado y salado, moldeado, prensado desmoldado, fajado, oreado, desfajado y maduración.

La maduración empieza, desde el momento del oreo, a temperatura ambiente (20-40°C). Diariamente, las piezas se descinchan, se voltean y se vuelven a fajar, operación que toma varios días. Los productores del auténtico Cotija no cuentan con cámaras de refrigeración, por tanto, mantienen el producto en el lugar más fresco de que disponen. Durante la maduración se vigila la temperatura del cuarto, su humedad relativa y se prodigan cuidados especiales a las piezas de queso para evitar enmohecimiento o un afinamiento desigual (Santos Moreno y Villegas de Gante 1997).

El rendimiento del queso puede variar considerablemente; esto puede ser reflejo del empleo de una leche pobre, de un mal proceso de elaboración, o de las dos cosas. Los rendimientos por arriba del 10% pueden ser aceptables. Uno de los parámetros de calidad importantes en el queso Cotija, y en varios quesos mexicanos, es el pH, el cual cuando es suficientemente bajo, contribuye a la conservación del producto, aún sin refrigeración (hasta dos meses si es menor a 5.20).

Durante los últimos años se ha empezado a vender queso “Cotija” que ya no se madura normalmente sino que se comercializa a los pocos días de haberse elaborado (aproximadamente se madura dos semanas). Esto le quita su característica más importante que es su largo añejamiento, y se debe a que los cotijeros no tienen capacidad financiera para pagar las reservas. Otro problema más grave es que circulan en el mercado “quesos Cotijas” que tienen ingredientes adicionados como: grasa vegetal, caseinatos, féculas, etc; y aunque sea conveniente tecnológicamente, no lo es legalmente pues constituye un fraude al consumidor, pues en ninguno de los dos casos se trata de auténtico Cotija.

En los últimos años se ha implementado la fabricación de queso tipo Cotija utilizando leche pasteurizada y cultivos lácticos, y los resultados son parecidos al tradicional (Santos Moreno y Villegas de Gante 1997).

3.0 Objetivos:

- **General:**

Determinar el efecto del tiempo de maduración del queso Cotija sobre la actividad proteolítica en el mismo.

- **Particulares :**

- Montar una técnica de determinación de actividad proteolítica en un gel de electroforesis (zimograma).

- Probar diferentes métodos de extracción para identificar en qué fracción se encuentra(n) la(s) proteasa(s); primero utilizando como control positivo un queso altamente proteolítico: el queso Camembert y después en el queso Cotija.
- Medir la actividad proteolítica en los extractos obtenidos del queso Cotija con diferentes grados de maduración.

4.0 Metodología

4.1 Determinación de actividad proteolítica en solución

- 1.-Se preparó de una solución de caseína al 2 % en buffer fosfato 0.05 M pH. 7.5.
- 2- En 3 tubos de ensayo (la prueba se realizó por triplicado) con 20 ml de la solución se añadió 0.1 ml de la enzima y se incubaron a 40°C
- 3- Se tomaron muestras de 500 µl de la reacción (proteólisis) a diferentes tiempos (0, 10, 20, 30, 90, 180 min)
- 4- Se mezclaron las muestras con 2.5 ml de TCA al 10 % para detener la reacción
- 5- Se centrifugó a 5000 rpm por 15 min.
- 6-Se separó el sobrenadante

Para medir la actividad se determinaron los péptidos producidos por la hidrólisis de la caseína, los cuales no precipitan con el TCA 10%.

Los péptidos se determinan de dos formas: mediante la absorbancia a λ 280 nm y por el método de Lowry. Ambos métodos se basan en la interacción con los grupos aromáticos: el primero por la excitación de ellos con luz uv, y el segundo por interacción de éstos con una solución a base de CuSO_4 .

La actividad enzimática en las Figuras 4, 5 y 6 se calculó a partir de la pendiente de la gráfica de concentración de péptidos contra tiempo empleando la curva patrón de seroalbúmina, cuya ecuación es: $y = 0.0017x + 0.0557$ y que se aprecian más adelante en las Figura 3.

4.1.1 Método de Lowry a λ 590 nm en celda plástica

Reactivos:

A.- Carbonato de sodio (J.T Baker, México) al 2% en NaOH 0.1N (Reactivos Analíticos REASOL, México) y agua desionizada.

B.- Sulfato de cobre (J.T Baker, México) al 1% en agua desionizada, almacenado a temperatura ambiente.

C.-Tartrato de sodio y potasio (J.T Baker, México) al 2 % en agua desionizada, almacenado a temperatura ambiente.

D.-Reactivo de Folin (Aldrich, E.U.A) 1:1 en agua desioinizada, almacenado a temperatura ambiente.

Procedimiento:

1.-Se mezcló 50 volúmenes de A +1 volumen de B + 1 volumen de C. A esta mezcla se le denomina solución de trabajo.

2- Se tomaron 5 ml de la solución de trabajo + 1 ml de muestra.

3.-Se reposó 10 min en la obscuridad.

4.-Se agregó 0.5 ml de D 1:1 con agua destilada.

5.- Se reposó 30 min en la oscuridad.

6.-Se leyó la absorbancia a 590 nm

La curva patrón de seroalbúmina (SA sigma, E.U.A) se preparó en un intervalo de 100 a 500 mg/ ml obteniendo los resultados que se observan en la Figura 3.

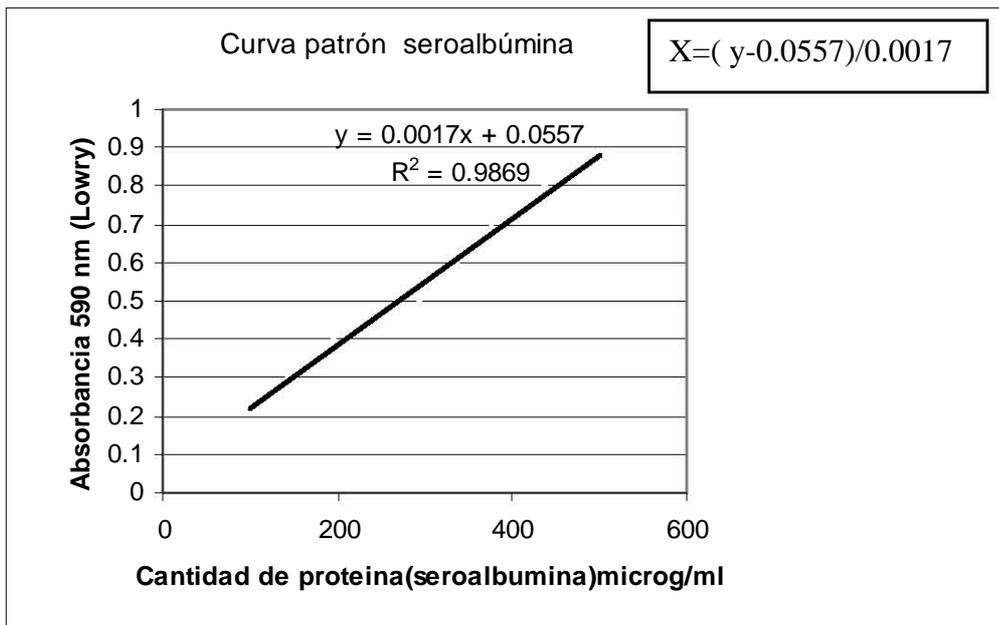


Figura 3. Curva patrón de seroalbúmina usada para determinar la actividad de la alcalasa en líquido.

4.2 Electroforesis Nativa

Reactivos:

- 1.- Solución de acrilamida al 30% almacenada a 4°C en frasco ámbar: N,N-metilen-bis-acrilamida, archilamida (Bio Rad, Hercules, E.U.A) y agua desionizada.
- 2.- Solución amortiguadora Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 almacenada en frasco ámbar a 4°C Tris (Reactivo grado electroforesis) (Bio Rad, Hercules, E.U.A), agua desionizada, HCl 6N (J.T.Baker, México).
- 3.- Solución amortiguadora Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 almacenado en frasco ámbar a 4°C Tris (Reactivo grado electroforesis) (Bio Rad, Hercules, E.U.A), agua desionizada, HCl 6N (J.T.Baker, México).
- 4.- Persulfato de amonio al 10% (Bio Rad, Hercules, E.U.A) conservado en frasco ámbar y dentro de desecador.
- 5.- TEMED, N,N,N',N'- Tetrametilendiamina (Bio Rad, Hercules, E.U.A) conservado en frasco ámbar.

6.-Solución amortiguadora de corrida pH 8.3 almacenada a 0°C o menor: tris y glicina (Reactivo grado electroforesis) (Bio Rad, Hercules , E.U.A), agua desionizada, HCl 6N (J.T.Baker, México).

7.- Solución amortiguadora de la muestra o colorante mantenida a temperaturas menores de 0°C; solución amortiguadora pH 6.8, glicerol (J.T.Baker, México) y azul de bromofenol (Bio Rad, Hercules , E.U.A),

8.-Solución desteñidota almacenada a temperatura ambiente: metanol y ácido glacial (J.T.Baker, México).

9.- Azul de Coomassie al 1% en solución desteñidota a temperatura ambiente: Coomassie Brilliant blue R- 250 (Bio Rad, Hercules , E.U.A).

10.-Solución de seroalbúmina 96-99 % (Sigma Chemical Co, St. Louis, E.U.A) de 2 mg/ mL almacenada en un vial a temperatura de congelación (< 0°C).

Procedimiento:

1.- Se montó el equipo para electroforesis limpio y seco (Equipo Miniprotean II y Miniprotean III).

2.-Se preparó el gel de separación a las proporciones de T yC que requiera cada experimento; desairear por 15 min en una bomba de vacío y colocar en el equipo de electroforesis (esperar gelificación y mantener hidratado).

3.-Se preparó el gel de concentración T= 4%, C= 1.5, siguiendo el mismo procedimiento que el anterior.

4.-Una vez listo el gel, se montó el equipo para correr, se vació la solución amortiguadora de corrida y se inyectaron las muestras (20 ml de colorante por cada 40 ml de muestra), la seroalbúmina como referencia.

5.-Se corrió durante aproximadamente una hora a 200 V hasta que el frente de la muestra recorrió todo el gel de separación, manteniendo la cámara a bajas temperaturas.

6.-Se colocaron los geles en azul de Coomassie por 30 min.

7.-Se retiró y pasó a 30mL de solución desteñidora por una hora o hasta que se lograron ver las bandas en el gel (se puede cambiar varias veces la solución desteñidora limpia); en el caso particular de este trabajo es también el mismo procedimiento pero con el objetivo de ver espacios blancos por la hidrólisis (proteólisis) de la caseína por acción de las proteasas contenidas en el extracto.

4.2.1 Zimogramas

Un zimograma es un método para poder medir la actividad “*in situ*” en un gel de electroforesis durante la corrida, o bien incubando después de haberla corrido.

4.2.1.1 Por inmersión.

Fundamento:

El objetivo de ésta metodología era lograr que la caseína penetrara en el gel y fuera hidrolizada por la alcalasa presente en el gel dejando zonas blancas.

Procedimiento:

1.-Se corrieron las proteasas en electroforesis nativa

2.-Una vez fijadas las proteínas en el gel con ac. acético al 7% , se sumergieron en una solución de caseína al 2% en en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.5(dejándolo cuatro horas).

6.-Se colocaron los geles en azul de Coomassie por 30 min.

7.-Se retiró y pasó a 30mL de solución desteñidora por una hora o hasta que se lograron ver las bandas en el gel (se puede cambiar varias veces la solución desteñidora limpia); en el caso particular de este

trabajo es también el mismo procedimiento pero con el objetivo de ver espacios blancos por la hidrólisis (proteólisis) de la caseína por acción de las proteasas contenidas en el extracto.

4.2.1.2 Por acoplamiento

Fundamento:

El objetivo de ésta metodología era lograr que la alcalasa del gel que tiene dicha enzima penetrara o actuara en el gel que tiene sólo caseína y ésta fuera hidrolizada por la alcalasa dejando zonas blancas debido a la hidrólisis.

Procedimiento:

- 1.- En uno de los geles se incluyó sólo caseína y en otro sólo las proteasas
- 2.-Se corrieron las proteínas en electroforesis nativa
- 3.-Una vez fijadas las proteínas en el gel con ac. acético al 7%, se acoplaron los 2 geles (se puso uno en frente de otro) y se sumergieron en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.5 (dejándolo 4 horas).
- 6.-Se colocaron los geles en azul de Coomassie por 30 min.
- 7.-Se retiró y pasó a 30mL de solución desteñidora por una hora o hasta que se lograron ver las bandas en el gel (se puede cambiar varias veces la solución desteñidora limpia); en el caso particular de este trabajo es también el mismo procedimiento pero con el objetivo de ver espacios blancos por la hidrólisis (proteólisis) de la caseína por acción de las proteasas contenidas en el extracto.

4.2.1.3 Con la caseína incluida

Fundamento:

El objetivo de ésta metodología era lograr que la alcalasa actuara en la caseína y ésta fuera hidrolizada por la alcalasa dejando zonas blancas debido a la hidrólisis.

Procedimiento:

- 1.- Se montó el equipo para electroforesis limpio y seco (Equipo Miniprotean II y Miniprotean III).
- 2.-Se preparó el gel de separación a las proporciones de T 6.6% (con la alcalasa) ó 10% (con los extractos de queso) y C 2.67%; para todos los casos se desairó por 15 min en una bomba de vacío, se agregó 0.05% de caseína (Caseina Art 2244 Merck 112v914944) y se colocó en el equipo de electroforesis.
- 3.-Se preparó el gel de concentración T= 4%, C= 1.5 %, siguiendo el mismo procedimiento que el anterior.
- 4.-En los pozos del gel de concentración se colocaron las muestras.
- 5.- Una vez fijadas las proteínas en el gel con ac acético al 7%, se sumergieron en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.5 (dejándolo 4 horas).
- 6.-Se colocaron los geles en azul de Coomassie por 30 min.
- 7.-Se retiró y pasó a 30mL de solución desteñidora por una hora o hasta que se lograron ver las bandas en el gel (se puede cambiar varias veces la solución desteñidora limpia); en el caso particular de este trabajo es también el mismo procedimiento pero con el objetivo de ver espacios blancos por la hidrólisis (proteólisis) de la caseína por acción de las proteasas contenidas en el extracto.

4.3 Extracción de proteína de queso

Primero se realizaron las pruebas usando el control positivo (queso Camembert) y después los quesos Cotijas.

Se probaron 3 diferentes métodos de extracción porque no se sabía en que fracción estaban la(s) proteasa(s).

4.3.1 Extracción de las proteínas de la fracción ácida (proteínas del suero)

Esta extracción se puede hacer usando fosfatos y citratos y con algunas diferencias ambas siguen el mismo procedimiento.

4.3.1.1 Extracción de proteínas con fosfatos

- 1.-Se disolvieron 5g de queso molido en buffer de fosfatos (0.1M pH 7)
- 2.-Se ajustó el pH de la disolución de 4.4-4.6 con HCl 1.41M (JT Baker, Xalostoc, México)
- 3.-Se filtró (filtro Whatman # 42) y obtener el extracto.

4.3.1.2 Extracción de proteína con Citratos

- 1.-Se disolvieron 5g de queso molido en 20 ml de disolución de citrato de Na^+ 0.5M
- 2.-Se agregó 40ml de H_2O destilada
- 3.-Se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100ml
- 4.-Se aforó con agua destilada
- 5.-Se agregó 10ml de HCl 1.41M a 100 ml de disolución queso-citrato de Na^+
- 6.-Se llevó a 125ml con agua destilada
- 7.-Se ajustó el pH a 4.4 +/- 0.05
- 8.- Se filtró (filtro Whatman # 42) y obtuvo el extracto.

4.3.2 Extracción de las proteínas de la fracción alcalina (proteínas asociadas a la caseína)

- 1.-Se pesó 0.6 g de queso molido
- 2.-Se disolvió en 25 ml de urea 8M pH 8 (JT Baker, Xalostoc, México).
- 3.-Se homogenizó por 2 minutos.
- 4.-Se incubó en baño de agua a 37°C por 2 horas (esto para solubilizar las caseínas).

- 5.-Se centrifugó a 10,000 rpm por 30 min a 4°C (Centrifuga Beckman J2-MI- Rotores JA20.1 y JA-20)
- 6.-Se filtró en papel watman # 42 para remover grasa y sólidos insolubles.
- 7.-Se dializó el filtrado 24 horas por lo menos en buffer de fosfatos de potasio pH 7
- 8.-Se liofilizó 1ml de filtrado (Liofilizadora LABCONCO Freeze Dry System / Freezone 4.5 y Congeladora LABCONCO Shell freezer).
- 9.-De aquí se sacó la inyección final para la electroforesis.

5.0 Resultados y discusión:

5.1 Selección de una enzima con actividad proteolítica

Inicialmente se realizó la prueba de actividad proteolítica en solución utilizando las enzimas papaína y alcalasa. El objetivo de hacer dicha prueba era encontrar una enzima que tuviera un buen nivel de actividad, hidrolizando el componente mayoritario del queso que es la caseína para que sirviera de modelo para el montaje de las técnicas y que pudiera trabajar en el gel de electroforesis. Los péptidos producidos por la acción de la proteasa permanecen solubles después de la precipitación de proteínas por TCA, por lo que dicha medición determina la actividad de la enzima.

En un principio se utilizó la papaína. Se realizó una prueba por triplicado y en la Figura 4 se reportan los promedios.

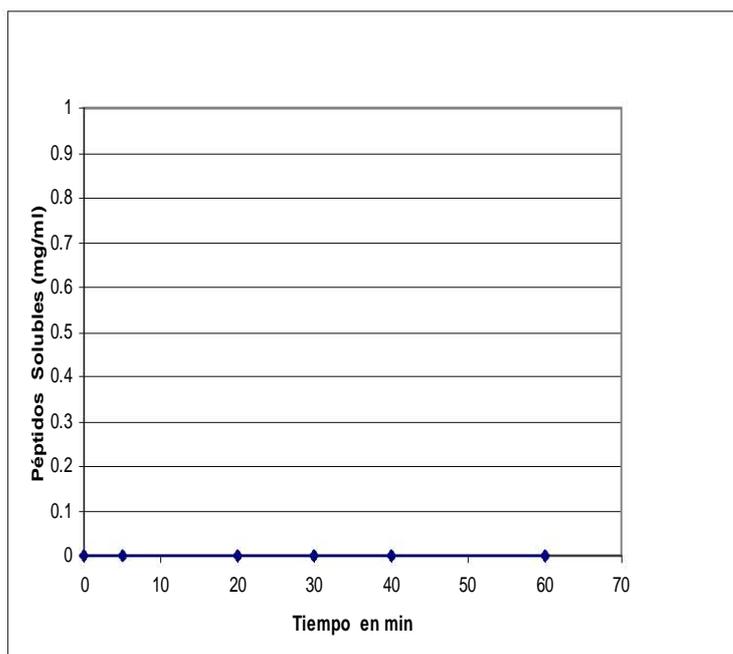


Figura 4. Actividad de papaína en solución de caseína durante 1 hora.

Se puede observar en la Figura 4 que la cantidad de péptidos solubles y la V_0 de la actividad de la papaína se mantiene en cero. Es decir, que no hubo hidrólisis de la caseína por acción de la papaína, al menos no la suficiente en el tiempo que se dió a la reacción. Esto puede deberse a que la papaína empleada quizá ya no tenía actividad.

La papaína no ofreció los resultados deseados por lo que se utilizó la alcalasa, enzima altamente inespecífica que ha sido reportada como productora de péptidos bioactivos a partir de diversas fuentes de proteína (Korhonen y Pihlato 2003).

Para determinar el rango de tiempo adecuado para medir la actividad de la alcalasa, inicialmente se midió la actividad durante 3 horas. Ver Figura 5.

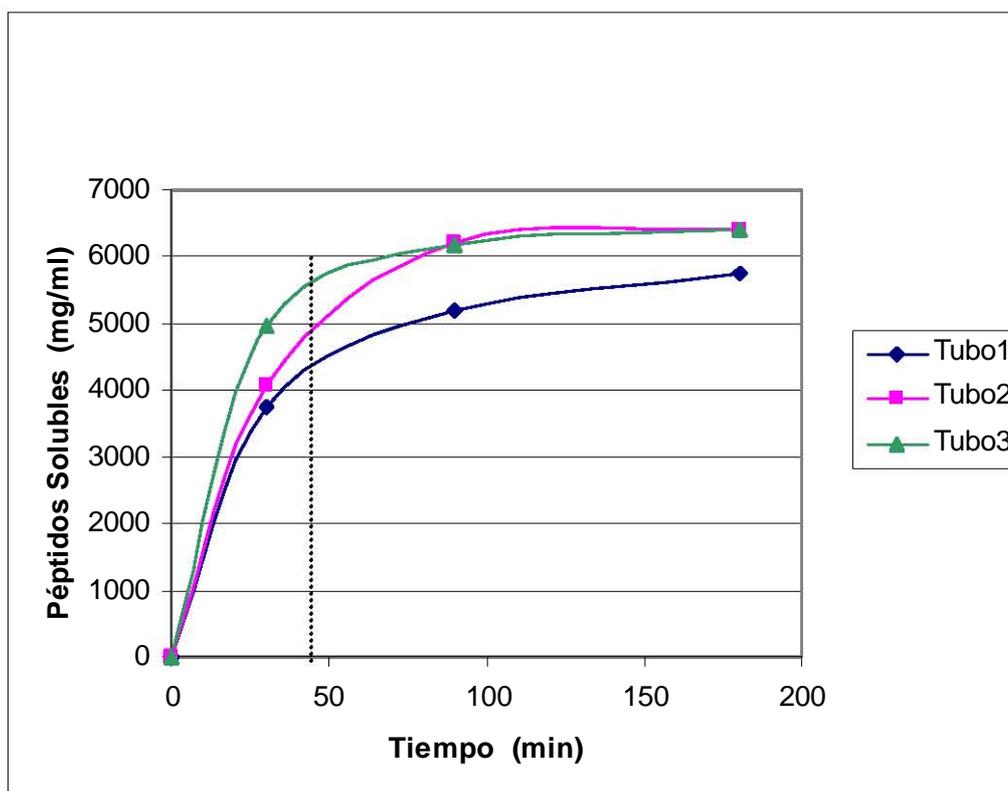


Figura 5. Actividad de alcalasa en solución de caseína durante 3 horas

En la Figura 5 se observa que la parte lineal de la gráfica donde puede determinarse la velocidad inicial de la reacción (V_0), se encuentra dentro de la primera media hora, por lo que se tomó este tiempo para las siguientes determinaciones. Ver Figura 6.

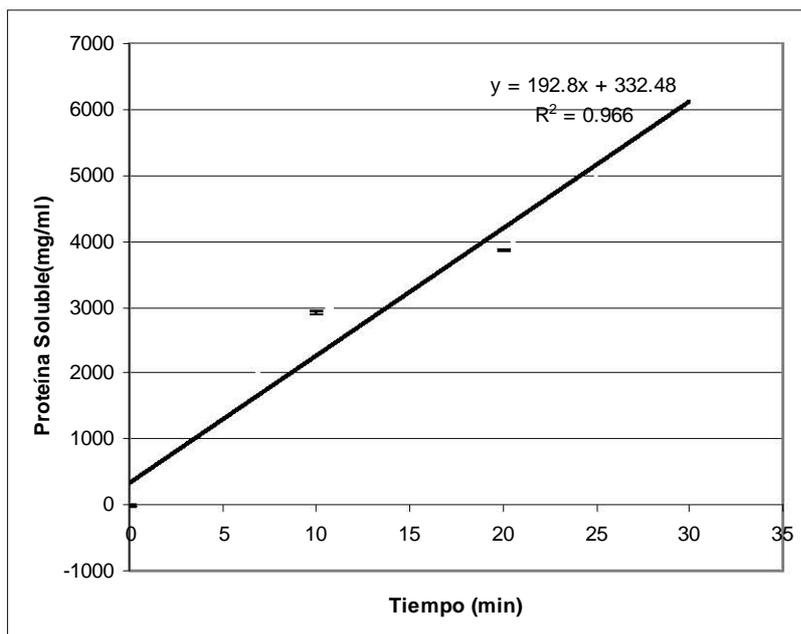


Figura 6. Actividad de alcalasa en solución de caseína durante 30 minutos

Tabla 2. Desviación estándar en los promedios del experimento por triplicado para determinar la velocidad inicial de la proteólisis realizada por la alcalasa sobre una solución de caseína al 2%

| Tiempo (min) | Promedio de la proteína soluble (mg/ml) | Valor de la desviación estandar | Porcentaje de la desviación estandar |
|--------------|---|---------------------------------|--------------------------------------|
| 10 | 2922.09 | 349.43 | 11.9 |
| 20 | 3862.65 | 994.68 | 25.75 |
| 30 | 6113.12 | 599.70 | 9.81 |

Al igual que en la Figura 4, la prueba se realizó por triplicado y se graficó el promedio que se ve en la Figura 6. La velocidad inicial (V_0) es 192.8 (mg/mL*min); si se compara esta velocidad contra la obtenida anteriormente, es decir cero, y al observar la Figura 6 y la Figura 4 se puede concluir que en

efecto la papaína tiene una actividad nula, y como la alcalasa si ofreció un alto nivel de actividad fue la utilizada en los siguientes experimentos para montar la técnica de los zimogramas.

5.2 Determinación de actividad proteolítica en gel.

Una vez que se seleccionó la proteasa a utilizar (alcalasa), se intentó determinar su actividad en un zimograma.

Debido a que no había ninguna metodología preestablecida para esta determinación, se probaron tres diferentes técnicas de determinación de actividad en geles de electroforesis para saber cual era la manera más eficiente para evidenciar la actividad.

Las tres metodologías probadas fueron las siguientes: a) una en la que sólo se corrió la alcalasa y después se sumergió en una solución de caseína al 2% a pH 7.5 que es el óptimo de la alcalasa; b) otra en donde se empalmaron dos geles, uno que contenía sólo alcalasa y otro que tenía sólo caseína al 2%, y se sumergieron en buffer de fosfatos al mismo pH (7.5) ; y c) donde el gel de electroforesis incluía tanto la alcalasa como la caseína (sumergiéndole en buffer fosfatos pH 7.5). A continuación se muestran los resultados que arrojaron las tres metodologías.

5.2.1 Método de inmersión (gel con alcalasa sumergido en caseína)

En ésta técnica se corrieron geles nativos de electroforesis con la enzima alcalasa, después de la corrida se fijó con ácido acético al 7.5% y se les sumergió en una solución de caseína al 2%; se esperaba que la caseína penetrara en el gel de electroforesis y que en las regiones donde hubiera una proteasa activa la caseína fuera hidrolizada; esto se evidenciaría después de la tinción con azul de Coomassie por la aparición de espacios blancos en los que no había caseína que se tiñera. Los geles se incubaron por cuatro horas; la razón de haberlo dejado tanto tiempo incubando fue que es mucho más difícil hidrolizar en sólido la caseína que en líquido (en menos de una hora). La Figura 7 muestra los resultados obtenidos.

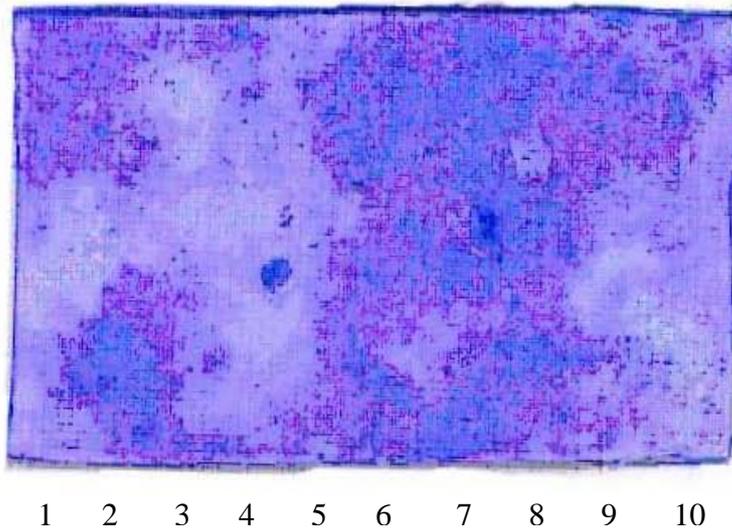


Figura 7. Gel con alcalasa sumergido en una solución de caseína. En los carriles 2, 5 ,6 y 9 se inyectó alcalasa; en los demás carriles no se inyectó nada.

Como puede apreciarse en la Figura 7, en este experimento no pudo evidenciarse una zona de actividad definida; se esperaba que al estar fija la alcalasa (anclada) en un lugar específico, la hidrólisis fuese puntual y en el mismo lugar, pues es el sitio en que están los dos elementos necesarios para llevar a cabo una reacción de hidrólisis: el sustrato y la enzima. Una posible explicación de las manchas poco uniformes en el gel de la Figura 7 es que la caseína no hubiera penetrado el gel correctamente. Para comprobar si la caseína era capaz de penetrar al gel y mantenerse ahí se preparó un gel de acrilamida igual a los usados, y una fracción se sumergió en la solución de caseína y otra no para luego teñirlas. Los resultados se observan en la Figura 8.

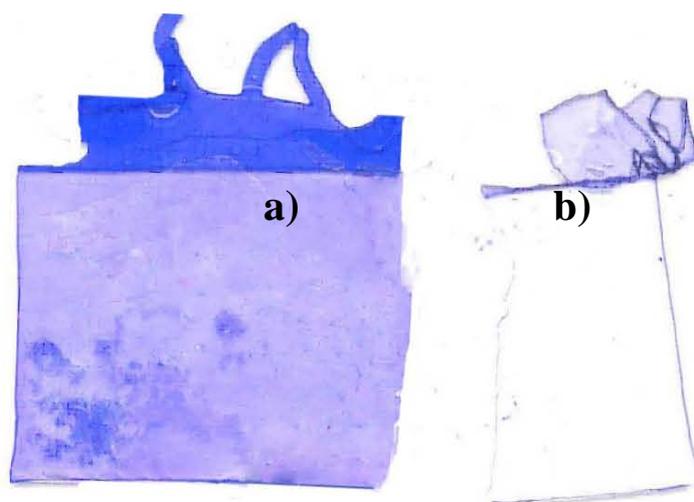


Figura 8. Gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie a) Sumergido durante 4 horas en una solución de caseína y b) Sin sumergir en caseína.

Al observar las dos secciones del gel en las Figuras 8a y 8b se puede ver que cuando éste se sumergió en caseína y se tiñó empleando azul de Coomassie se obtiene un color azul uniforme, mientras que si no se sumerge en caseína no hay proteína para que el azul de Coomassie la tiña. Esto demuestra que en efecto, la proteína puede penetrar al gel cuando éste se sumerge en una solución de caseína y que ésta puede ser teñida por el azul de Coomassie, por lo que se descartó la migración deficiente de la caseína como causa de que no se pueda evidenciar la actividad, lo cual muy probablemente se deba a que la alcalasa migrara fuera del gel realizando la hidrólisis en su exterior y por lo tanto no quedó marca de la actividad en el gel; o bien, pudo haber habido un exceso de caseína en la solución que no se hidrolizaba tan rápido como penetraba en el gel.

5.2.2 Método de acoplamiento (gel con alcalasa y gel con caseína)

Una segunda metodología consistió en correr una electroforesis nativa de la alcalasa (Figura 9a) y preparar por separado un gel con caseína al 2% (Figura 9b). Después de correr los geles se empalmaron y se incubaron durante cuatro horas para, posteriormente teñir el gel que contenía caseína con azul de Coomassie para evidenciar si había habido alguna hidrólisis.

El propósito de esto era conseguir que la alcalasa fija en el gel actuara sobre la caseína y la hidrolizara, dejando en el gel de sólo caseína espacios en blanco por la acción de la hidrólisis.

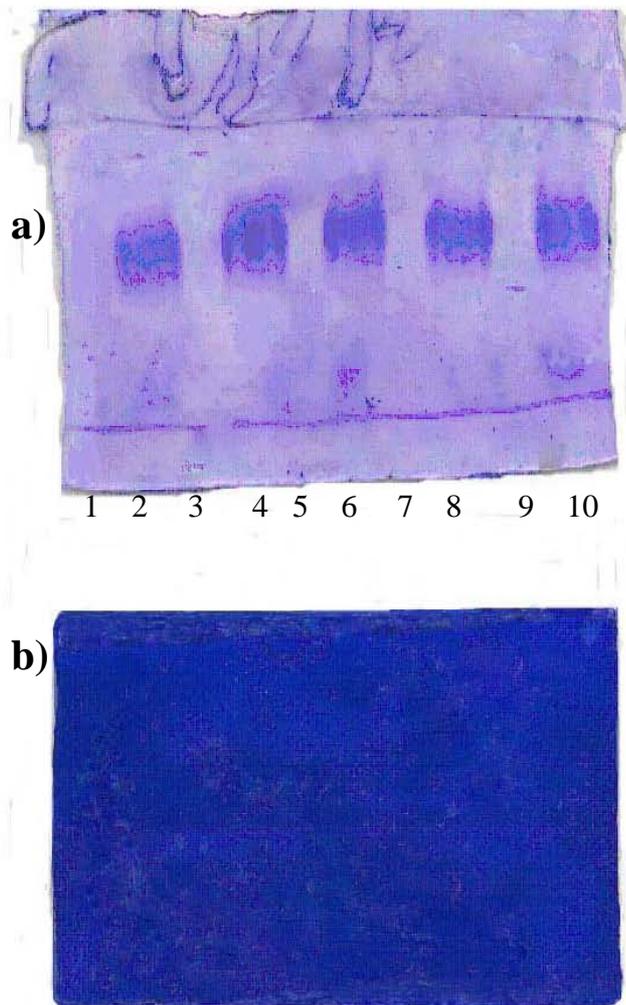


Figura 9 Determinación de actividad por acoplamiento de dos geles: a) Gel en donde en sus carriles 2, 4, 6, 8 y 10 se inyectó alcalasa y b) Gel con caseína

Al observar la Figura 9 se puede ver que en el gel con caseína no existen zonas blancas de hidrólisis, quizás porque la alcalasa no está en verdadero contacto físico con la caseína, por lo que es posible que la proteasa aunque hubiese migrado fuera del gel fue incapaz de penetrar y actuar sobre la caseína; es decir, tuvo una acción nula o extremadamente reducida por ello el método quedó descartado.

5.2.3 Con la caseína incluida

El tercer método probado consistió en correr a la alcalasa en un gel de electroforesis nativo con caseína al 2% y posteriormente incubarlo para permitir la acción de la proteasa. Para determinar cuanto tiempo era necesario dejar actuar a la alcalasa, el gel fue partido en varios fragmentos que se incubaron a 40°C, pH 7.5 en buffer fosfatos durante diferentes tiempos. El gel se tiñó posteriormente para evidenciar la zona donde hubiera habido proteólisis. Los resultados se muestran en la Figura 10.

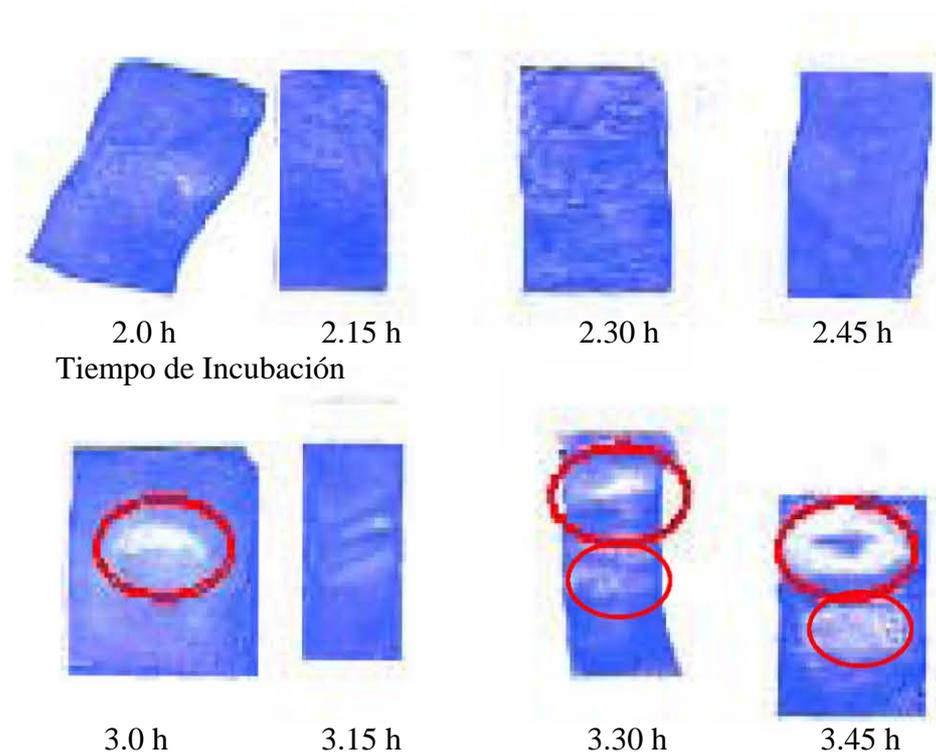


Figura 10. Determinación de actividad de alcalasa con caseína incluida a diferentes tiempos (determinación del tiempo de hidrólisis de la alcalasa).

Como se puede observar en la Figura 10 se obtuvo actividad, la cual está marcada a las 3.0, 3.30 y 3.45 horas. No se consideran los fragmentos correspondientes de los tiempos 2.0, 2.15, 2.30, y 2.45 h porque las zonas blancas son mucho menos definidas e intensas; también son más irregulares, lo que puede deberse a una incorrecta tinción de esos fragmentos. En los fragmentos de los tiempos 3.30 y 3.45 h, se aprecia que hay dos zonas de hidrólisis; esto quizás se deba a que por ser una proteasa comercial, no es 100% pura. Comparando estos fragmentos con el gel de la Figura 9a se observa que no existe más de una banda en los carriles donde se inyectó la alcalasa; es decir, que muy posiblemente sea otra proteasa, que a pesar que está en muy poca cantidad tiene una actividad específica muy alta, o al menos la suficiente para detectarse por su capacidad hidrolítica.

Finalmente tras varios experimentos se determinó que la tercera metodología, es decir, la que incluía tanto las proteasas como la caseína en el mismo gel, es útil para apreciar zonas de hidrólisis en la caseína.

5.3 Determinación del método adecuado para extraer proteasas del queso

Una vez que se tuvo una metodología confiable para evidenciar zonas de hidrólisis en un gel con caseína, era necesario obtener un método para extraer las proteasas de los quesos, pues aunque el método demostró ser efectivo con una enzima concentrada era necesario conocer si era aplicable a extractos de quesos que no son proteínas puras ni concentradas. Para montar la técnica se empleó como control positivo al queso Camembert pues se sabe que posee una alta actividad proteolítica. Posteriormente a la extracción de proteasas de quesos se llevó a cabo una concentración ya sea por liofilización y resuspensión en buffer de fosfatos 0.1M pH 7 ó por ultrafiltración. El método de la liofilización resultó ser el más efectivo, pues la muestra se concentra más y en mayor cantidad

Se probaron tres métodos de extracción de proteína: dos ácidos: uno con fosfatos y otro con citratos (ajustados a pH 4.4 - 4.5) que son utilizados para extraer proteínas o péptidos de las proteínas del suero, y uno alcalino utilizando urea 8M ajustada a pH 8 que es empleado para la extracción de proteínas y péptidos de las caseínas. El motivo de realizar estas pruebas fue para conocer si con la extracción ácida o en la alcalina se recuperaban con mayor eficiencia la(s) proteasa(s) del queso capaces de hidrolizar el componente mayoritario del queso que es la caseína, y que muy posiblemente sean productoras de péptidos bioactivos. Tanto la extracción de proteasas de citratos como la de fosfatos se basan (con algunas diferencias) en extracciones ácidas con las que se extraen proteínas solubles en dichas condiciones como las proteínas del suero; se espera que de haber proteasas asociadas a dichas proteínas con alguno de ambos métodos se puedan extraer.

5.3.1 Extracción de proteasas de queso Camembert con citratos

La extracción se realizó de la manera que se indicó en la parte de metodología (utilizando una solución de citrato de sodio); posteriormente el extracto liofilizado que fue resuspendido y concentrando al doble se inyectó en el gel de electroforesis, se corrió, se fijó con ácido acético y se

sometió a incubación en buffer de fosfatos pH 7. Se dejaron actuar hasta por 8 horas porque si la alcalasa que es una enzima altamente proteolítica y más concentrada que lo que se encuentra en el queso tardó entre 3 y 4 horas para actuar, entonces las proteasas que se lograran aislar con la solución de citratos requerirían mucho más tiempo. Los resultados se muestran en la Figura 11.

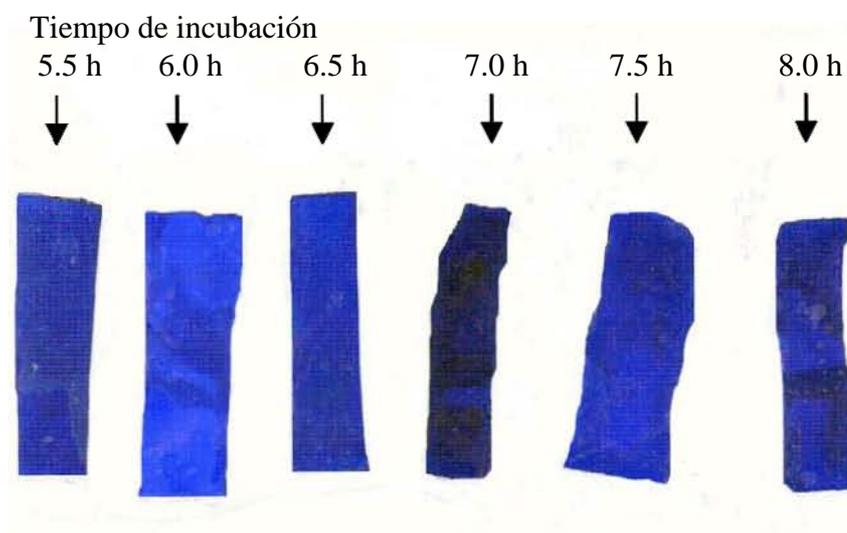


Figura 11. Fragmentos de gel de electroforesis con extractos ácidos de citrato de queso Camembert incubados a diferentes tiempos.

En cada uno de estos geles se inyectó extractos ácidos de citrato de queso Camembert que se dejaron actuar sobre caseína que viene incluida en el gel, pero como se aprecia no hay zonas blancas de actividad aún tras ocho horas de incubación, lo que quiere decir que no hay actividad proteolítica suficiente en el extracto ácido con citrato.

5.3.2 Extracción de proteasas de queso Camembert con fosfatos

Se decidió utilizar la extracción con fosfatos porque el campo de acción de la solución de fosfatos (PO_4^{3-}) es diferente del ión citrato ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7^{3-}$) como se puede concluir tras observar sus respectivos pK (3.128, 4.76, 6.396 del ión citrato contra 2.148, 7.199, 12.15 del ión fosfato) (Harris 1992). Mientras que el citrato es capaz de soltar cationes como H^+ , Na^+ , etc; o bien interactuar con algún otro tipo de compuesto como una enzima en un rango de pH más cerrado, el de los fosfatos es más amplio. En el caso particular de este experimento esto nos permite que la solución de fosfatos extraiga proteasas con uno, dos o tres sitios cargados susceptibles de ser protonados-desprotonados.

La extracción se realizó como se indicó en la parte de metodología utilizando una solución de fosfato de potasio que fue concentrada al doble, después se inyectó en el gel de electroforesis, se corrió, se fijo con ácido acético al 7% y se sometió a incubación en buffer de fosfatos pH 7. Se dejaron actuar hasta por ocho horas al igual que en el experimento anterior para que el tiempo no fuera un factor limitante y por la misma razón antes explicada de que siendo la alcalasa una enzima altamente proteolítica y más concentrada tardó entre tres y cuatro horas para actuar, entonces las proteasas aisladas con la solución de fosfatos requerirían mucho más tiempo. Los resultados se muestran en la Figura 12.

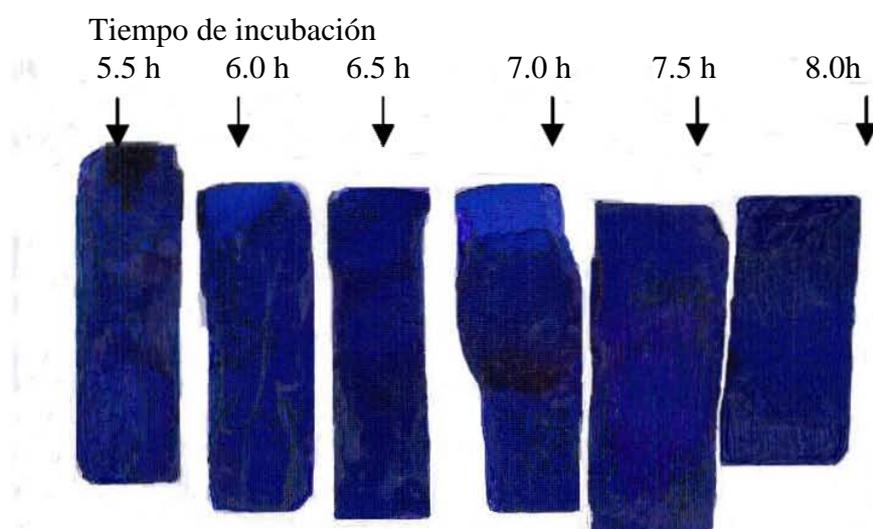


Figura 12. Fragmentos de gel de electroforesis con extractos ácidos de fosfatos de queso Camembert incubados a diferentes tiempos.

Como se aprecia en la Figura 12 no hay zonas blancas de actividad lo que quiere decir que no hay proteasas en el extracto ácido con fosfatos, o al menos no en una concentración suficiente.

5.3.3 Extracción de proteasas de queso Camembert con urea

Dado que en ninguno de los dos métodos ácidos se encontraron proteasas, se probó con urea esperando que en la fracción alcalina sí se encontraran proteasas.

Esta extracción se realizó como se señaló en la parte de metodología (utilizando una solución de urea 8M pH 8), posteriormente se inyectó concentrada como en los otros métodos de extracción en el

gel de electroforesis, se corrió, se fijó con ácido acético y se sometió a incubación en buffer de fosfatos pH 7. Se dejaron actuar hasta por ocho horas al igual que en los dos experimentos anteriores por la misma razón que se explicó en esos experimentos. Los resultados se muestran en la Figura 13.

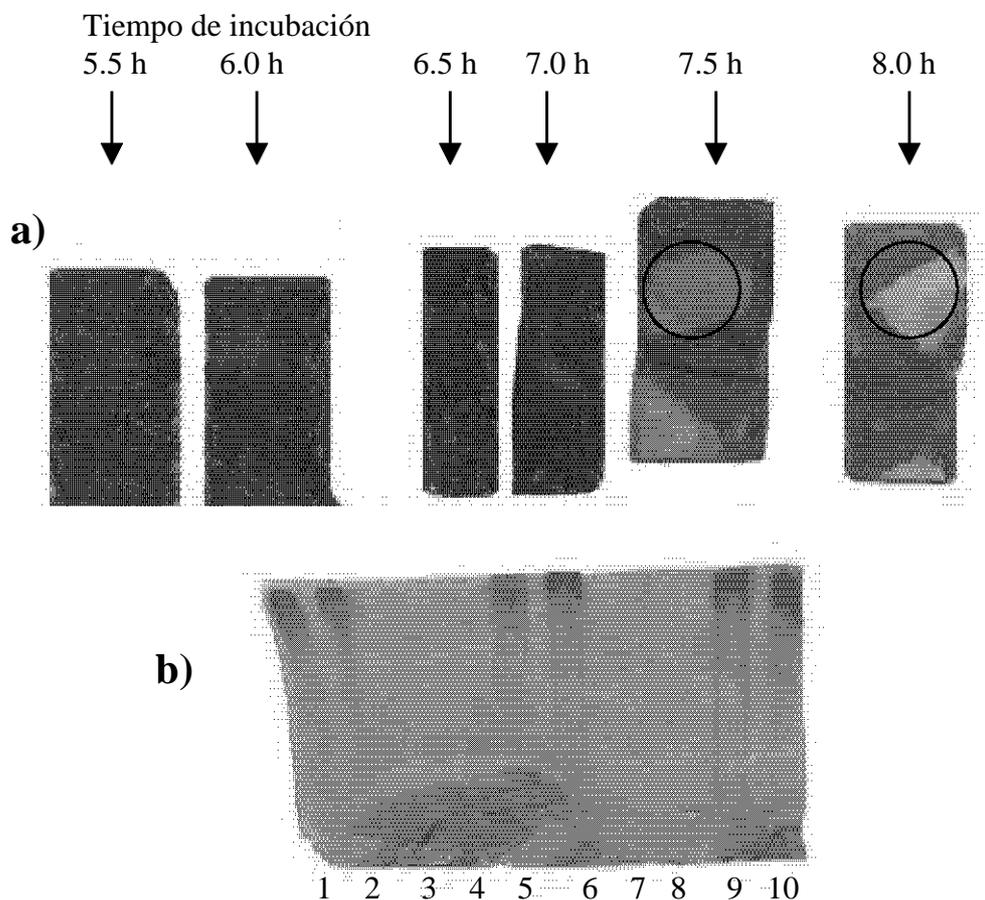


Figura 13. Determinación de actividad proteolítica en los extractos de urea de queso Camembert a) Fragmentos con caseína y extracto alcalino de queso Camembert sometidos a incubación, b) Gel sin caseína con extracto de urea de queso Camembert. En ambos grupos de gels a) y b), los carriles 1, 2, 5, 6, 9 y 10 contienen extracto alcalino concentrado al doble de queso Camembert.

Las tiras de gel de la Figura 13a) corresponden al gel con caseína (en el cual se inyectaron extractos alcalinos de queso Camembert, al igual que en la Figura 13b). Como en los casos anteriores se incubaron a 40°C por distintos periodos de tiempo y como puede apreciarse las tiras donde hay actividad son las que corresponden a las 7.5 y 8 h. Este método se realizó varias veces mostrando la misma constante, es decir la hidrólisis sólo se daba en el extracto alcalino y después de 6-7 horas. No

se calculó la masa molecular de las proteasas porque hasta este punto no se utilizó patrón de masas moleculares

Ni en los extractos de citrato ni en los de fosfato se obtuvo actividad proteolítica, únicamente en el obtenido usando urea se observaron zonas de actividad. Esto indica que las proteasas están asociadas a la fracción de caseína (puesto que la caseína es soluble en pH alcalino) y esto es una posibilidad pues la caseína es el componente mayoritario del queso, es decir, el sustrato sobre el cual tendrán que actuar las proteasas para hidrolizarlo y generar péptidos, algunos de los cuales pueden tener bioactividad; además los quesos tienen una mucho mayor proporción de caseína que de proteínas de suero. La razón de porqué tardaron tanto en actuar las proteasas no es de extrañar pues su concentración debe ser muy baja.

5.4 Determinación de actividad proteolítica en queso Cotija con diferentes grados de maduración.

Una vez que se estableció la metodología completa se hicieron extractos del queso Cotija con diferentes grados de maduración.

Tomando esto en cuenta se realizaron extractos tanto ácidos (porque aunque en el queso Camembert no se evidenció actividad en los extractos ácidos, quizá al ser un queso distinto la situación podría ser diferente) como alcalinos de queso Cotija de diferentes grados de maduración (Figuras 14 a Figura 19), donde el único que mostró tener actividad fue el extracto alcalino de queso Cotija de mediana maduración (Figuras 16, 17, 18 y 19) como se puede concluir al observar las zonas blancas de hidrólisis. En estos cuatro geles, además del extracto de queso Cotija de mediana maduración, también se inyectaron en los primeros dos carriles extractos de queso Camembert como control positivo. En la Figura 20, se corrió un gel en las mismas condiciones pero sin caseína con el propósito de observar la presencia de las proteínas totales extraídas al teñir con azul de Coomassie.

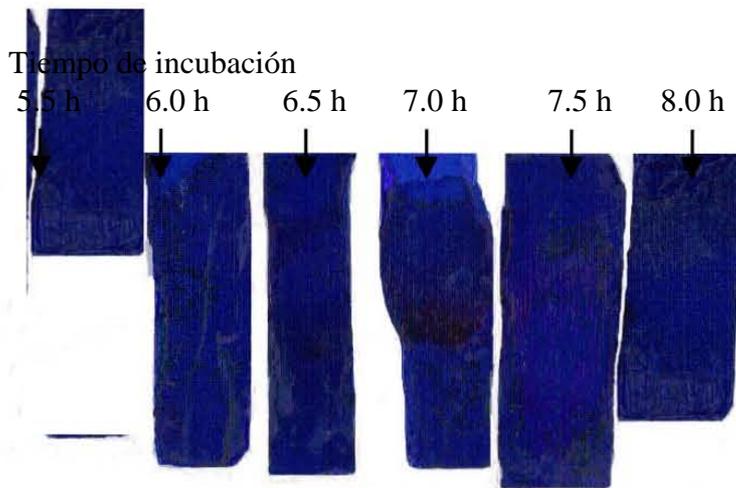


Figura 14. Fragmentos de gel de electroforesis con caseína al 0.1% con extractos alcalinos de urea de queso Cotija de poca maduración incubados a diferentes tiempos.

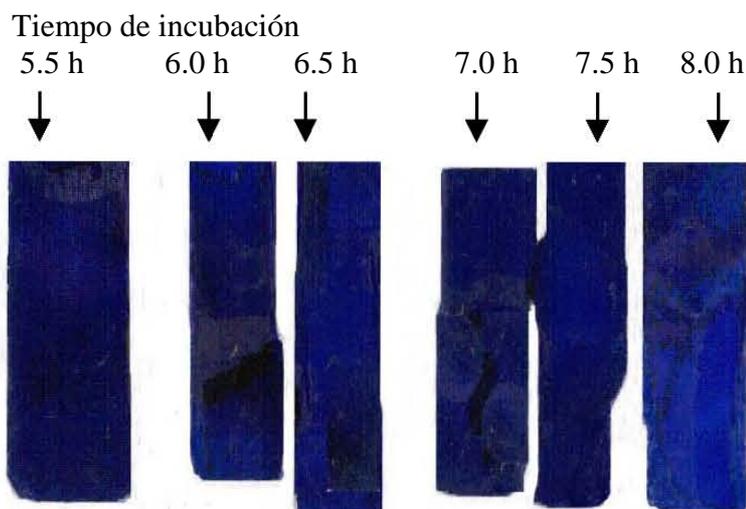


Figura 15. Fragmentos de gel de electroforesis con caseína al 0.1% con extractos alcalinos de queso Cotija muy maduro incubados a diferentes tiempos.

Al observar la Figura 14 y la Figura 15 no se observan zonas blancas de protéolisis, esto implica que las proteasas encontradas en los extractos del queso Cotija poco madurado es decir 15 días de maduración (Figura 14) sean muy pocas, y en el extracto del queso muy madurado el de más de un año de maduración (Figura 15) posiblemente ya no tengan actividad.

En los geles de las Figuras 17 y Figura 19 se puede apreciar las zonas más evidentes de hidrólisis que concuerdan con bandas de proteasas de la Figura 20, es decir el que sólo tiene extractos alcalinos sin caseína en el gel.

Los resultados en las figuras: 16, 17, 18 y 19, que corresponden al mismo zimograma pero mostrado en diferentes tonos de azul y gris para que se puedan apreciar con más claridad las diferentes zonas de hidrólisis, revelaron que el queso Cotija si tiene actividad proteolítica pero menos marcada que en el queso Camembert.

Un punto importante que se debe observar es que son más las zonas de hidrólisis correspondientes al queso Camembert y más intensas que las del queso Cotija; esto es lógico pues se sabe que en el queso Camembert existe una alta actividad proteolítica por lo que no es de extrañar que dicha actividad se muestre más marcada.

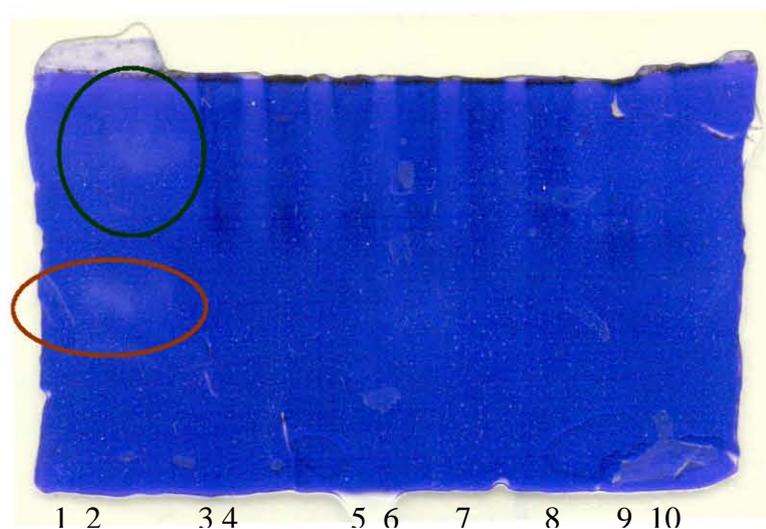


Figura 16. Determinación de actividad proteolítica en los extractos de urea de queso Camebert, y queso Cotija. Tiempo de incubación 9h; T=10%; caseína al 0.1% Carriles 1 y 2 extracto alcalino de urea de queso Camembert. Carriles 3 al 8 extractos alcalinos de urea de queso Cotija de mediana maduración. Carril 9 seroalbúmina bovina, y carril 10 β -lg.

Como se puede ver en la Figura 17 y en la Figura 19 hay dos zonas de actividad proteolítica: la de los carriles 1 y 2 correspondientes al queso Camembert, y la de los carriles 3 al 8 correspondientes al queso Cotija de mediana maduración. Estos resultados concuerdan con los reportados por Korhonen y Pihlato (2003) quienes encontraron que el queso Gouda en su etapa intermedia de maduración tiene mayor actividad proteolítica que en otras etapas de su maduración.

La proteasa extraída del queso Cotija de mediana maduración que mostró la actividad más evidente, tiene de acuerdo a las electroforesis realizadas una masa molecular de 85.5 kDa. Las zonas de proteólisis del queso Camembert, revelaron proteasas con una masa molecular de 24.4, 73.3 y 97.7 kDa. Las masas moleculares de dichas proteasas se calculó utilizando los Rf y la masa molecular de la seroalbumina (la cual es conocida) empleando la Fórmula 1; las diferentes masas moleculares se pueden ver en la Tabla 3 y en la Tabla 4.

El nivel de actividad proteolítica en los quesos muy madurados es casi nula al igual que en los quesos con poca maduración. Probablemente la causa de esto sea que en los quesos Cotija de poca maduración aún no hay una cantidad suficiente de proteasas, ó que su pH ó aw no son los óptimos; mientras que en los muy madurados están inhibidos por producto, baja concentración de sustrato, pH, ó aw. Determinar los motivos exactos por lo que sucede esto no compete a este estudio y serán necesarios varios experimentos más para ello.

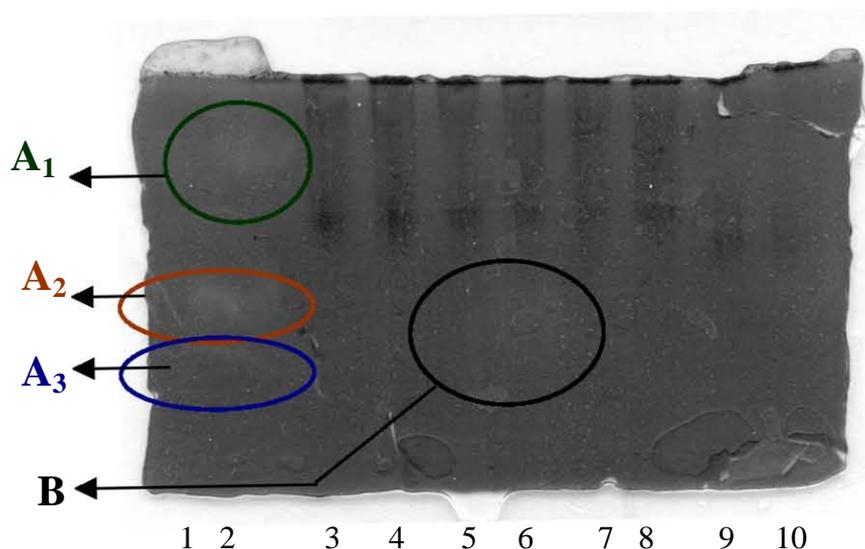


Figura 17. Determinación de actividad proteolítica en los extractos de urea de queso Camebert, y queso Cotija. Tiempo de incubación 9h; T=10%; caseína al 0.1% Carriles 1 y 2 extracto alcalino de urea de queso Camembert. Carriles 3 al 8 extractos alcalinos de urea de queso Cotija

de mediana maduración. Carril 9 seroalbúmina bovina, y carril 10 β -lg. A1, A2 y A3 zonas de hidrólisis del queso Camembert, B zona hidrólisis del queso Cotija

Fórmula 1 Utilizada para determinar las masas moleculares de las proteasas de los extractos apartir de la mm de la seroalbúmina y los Rf

$$MM \text{ proteasa} = \frac{(Rf_{\text{proteasa}})(66.2 \text{ kDa})}{Rf_{\text{SA}}}$$

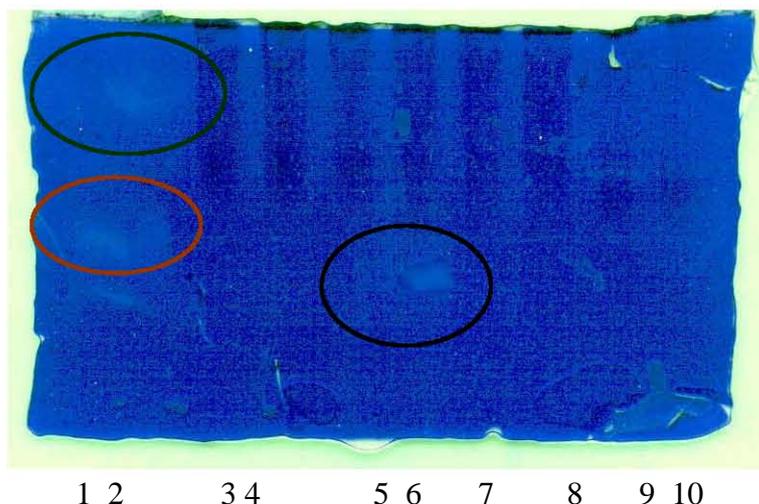


Figura 18. Determinación de actividad proteolítica en los extractos de urea de queso Camebert, y queso Cotija. Tiempo de incubación 9h; T=10%; caseína al 0.1% Carriles 1 y 2 extracto alcalino de urea de queso Camembert. Carriles 3 al 8 extractos alcalinos de urea de queso Cotija de mediana maduración. Carril 9 seroalbúmina bovina, y carril 10 β -lg.

Tabla 3 Masas moleculares de las proteasas encontradas en los extractos de urea de los quesos Camembert y Cotija calculados apartir de la Figura17.

| Zona de Hidrólisis | Rf | Masas Moleculares (kDa) |
|-------------------------------|------|-------------------------|
| A ₁ (Q Camembert) | 0.2 | 24.4 |
| A ₂ (Q Camembert) | 0.6 | 73.3 |
| A ₃ (Q Camembert) | 0.8 | 97.7 |
| B (Q Cotija) | 0.65 | 79.4 |

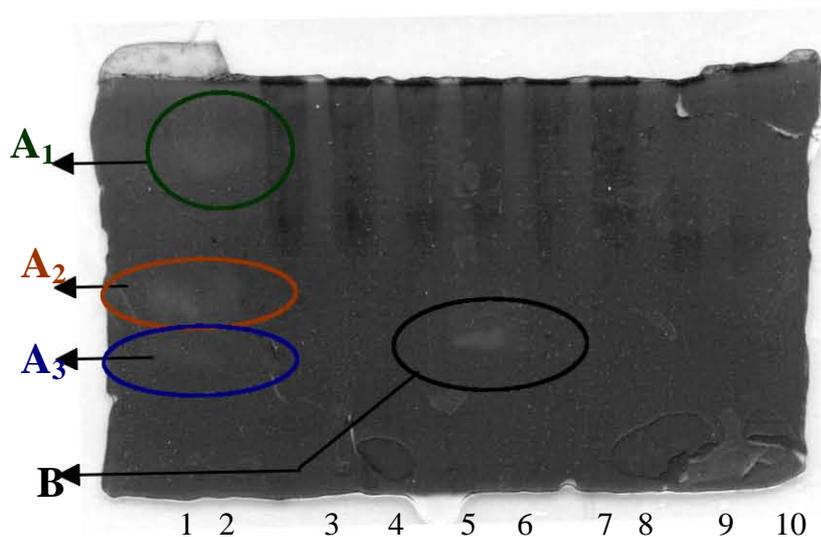


Figura 19. Determinación de actividad proteolítica en los extractos de urea de queso Camebert, y queso Cotija. Tiempo de incubación 9h; T=10%; caseína al 0.1% Carriles 1 y 2 extracto alcalino de urea de queso Camembert. Carriles 3 al 8 extractos alcalinos de urea de queso Cotija de mediana maduración. Carril 9 seroalbúmina bovina, y carril 10 β -lg.

Otro aspecto que se puede notar es que las zonas de actividad de las proteasas del queso Camembert y el queso Cotija no son iguales, es decir las correspondientes proteasas no tienen las mismas masas moleculares, debido muy probablemente a que son proteasas de diferentes orígenes microbianos. Después de todo son quesos que llevan procesos de manufacturación diferentes, lo que lleva a que en ambos quesos (Cotija y Camembert) los microorganismos presentes también lo sean; en el Camembert el principal microorganismo responsable de sus propiedades es un hongo: el *Penicillium camemberti*, en cambio en el queso Cotija son varios microorganismos pues se hace con leche sin pasteurizar; por lo tanto y en consecuencia también serán diferentes las proteasas y los péptidos generados.

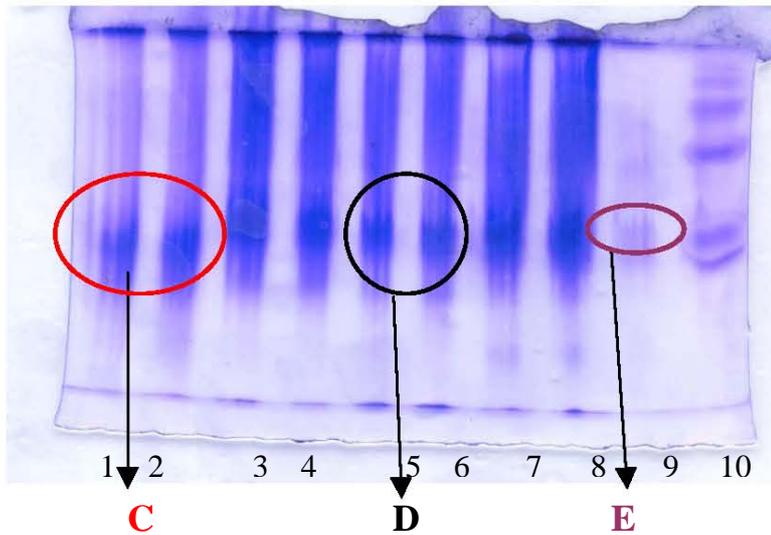


Figura 20. Gel de acrilamida sin caseína que se corrió paralelamente con el gel caseína de las figuras 14, 15, 16 y 17. En todos los casos se inyectó en los carriles 1 y 2 extracto alcalino de urea de queso Camembert. Carriles 3 al 8 extractos alcalinos de urea de queso Cotija de mediana maduración. Carril 9 se inyectó seroalbúmina bovina, y carril 10 β -lg. C, D son zonas donde se espera hidrólisis en los geles 14, 15, 16 y 17. E zona donde se concentró la seroalbúmina y se utiliza para apartir de ese Rf y su masa molecular conocida calcular las masas moleculares de las proteasas de los quesos.

Tabla 4 Masas moleculares de las proteasas encontradas en los extractos de urea de los quesos Camembert , Cotija y de la seroalbumina. Calculadas a partir de la Figura 20.

| Banda de Proteína | Rf | MM(kDa) |
|--------------------------|------|----------|
| C (Q Camembert) | 0.6 | 74.39 |
| D (Q Cotija) | 0.56 | 69 |
| E (Seroalbumina) | 0.54 | 66.2 |

6.0 Conclusiones:

Se logró montar una técnica para medir actividad proteolítica en extractos de queso. La técnica resultó ser positiva para la determinación de actividad proteolítica tanto cuando se utilizó la alcalasa en solución como cuando se emplearon extractos de queso. Sin embargo, no es una técnica muy sensible, sobre todo con los extractos, aunque se aumenta la sensibilidad si la fijación de las proteasas es breve y la determinación de la actividad se hace inmediatamente después. De preferencia requiere de tener muy concentrados los extractos proteolíticos empleando la liofilización-resuspensión y no por ultrafiltración. Con respecto al queso Cotija podemos decir que el momento de mayor actividad proteolítica es en los quesos de mediana maduración (3 meses de maduración) como se ha demostrado también para el queso Gouda en otras investigaciones Korhonen y Pihlato (2003). Proteasas, quizás generadoras de péptidos bioactivos, fueron encontradas en los quesos en la fracción alcalina que es la asociada a las caseínas, pero a pesar de que en los zimogramas no se encontraron proteasas en la parte ácida, que es la asociada a las proteínas del suero, esto no indica que sea nula su existencia sino que posiblemente es tan reducida su cantidad que no resultan suficientes para hidrolizar las proteínas del queso en las condiciones probadas.

7.0 Bibliografía:

- **Alais C. 1970. Ciencia de la leche. Ed Continental S.A de C.V, México, páginas 40, 41,110-113,134-136.**
- **Amiot J. 1991. Ciencia y Tecnología de la leche. Ed Acribia S.A, Zaragoza, páginas 23-26,31-33,40, 262-267, 279-289.**
- **Arenas Castañeda Melibea. 2006. Tesis “Interacción del Formaldehído con las Proteínas de la leche y su Efecto en la Elaboración de Queso Fresco”. Facultad de Química, UNAM, páginas 43-45.**

- **Clare D.A y Swaisgood H.E. 2000. Bioactive Milk Peptides: A prospectus. Journal of Dairy Science, 83, 1187-1195.**

- **Flores Najera Ma. Angélica. 2001. Tesis “ Utilización de *Streptococcus thermophilus* SY-102 Productor de exopolisacárido en la elaboración en la elaboración de Queso Tipo Manchego”. Universidad Autónoma de Tlaxcala, páginas 5- 31.**

- **García Garibay M, Quintero Ramírez R y López Munguía Canales A. 2000. Biotecnología Alimentaria. Ed Limusa, México D.F., páginas 179-196.**

- **García-Cozar F, Aguado E y Peña J. 2003. Inmunoglobulinas En: Inmunologiaonline, José Peña Martínez (Coordinador):
http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/texto_pdf/tema_03.pdf**

- **Harris D C. 1992. Analisis Químico Cuantitativo Apéndice G Constantes de Acidez. Ed Iberoamérica, México D.F. ,página 805.**

- **Investigación y Desarrollo. 2002. Periódico La Jornada Suplemento de Ciencia y Tecnología. Tecnología para un queso de tradición. Enero:
<http://www.invdes.com.mx/anteriores/Enero2002/htm/queso.html>**

- **Keating P.F y Rodríguez Gaona H. 1999. Introducción a la Lactología. Ed Limusa, México D.F., páginas 214, 215, 219-221.**

- **Korhonen H. y Pihlanto A. 2003. Bioactive peptides: new challenges and opportunities for the dairy industry. Australian Journal of Dairy Technology, 58 (2), 129-133.**

- **Korhonen H., Pihlanto-Leppala A., Rantamaki P y Tupasela T. 1998. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. Trends in Food Science and Technology, 9, 307-319.**

- Mendez Palacios Iris Adriana. 2004. Tesis “Desarrollo de un sistema de Estampado Molecularmente para la Recuperación de Lactoferrina”. Facultad de Química, UNAM, páginas 32, 33, 36-38.
- Ortiz Chao Paola Adriana. 2004. Tesis, “Estudio de la interacción de las proteínas del suero de leche con la β - galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* y su efecto en la actividad”. Facultad de Química, UNAM, páginas 9-20.
- Periodico La Jornada. Saade Carmen (Directora General) 2006. Eligen al queso de Cotija, Michoacán, como el mejor del mundo este año:
<http://www.jornada.unam.mx/2006/11/14/index.php?section=estados&article=037n3est>
- Santos Moreno A y Villegas de Gante A. 1997. El queso Cotija propuesta para su fabricación a partir de leche pasteurizada. *Lácteos y Cárnicos Mexicanos*, 12 (3), 7-10.
- Schanbacher F, Talhouk R y Murria F. 1997. Biology and origin of bioactive peptides in milk, *Elsevier Livestock Production Science*, 50, 105-123.
- Scott R. 1991. Fabricación de queso. Ed Acribia S.A, Zaragoza, páginas 47-49, 60-62.
- Shah N. 2000. Effects of milk derived bioactives: an overview. *British Journal of Nutrition*, 84, suppl. 1, S3-S10.

Silva S.V. y Malcata F. X. 2005. Casseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15, 1-15.