



---

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**ANÁLISIS DE LOS PÉPTIDOS LIBERADOS  
DURANTE LA MADURACIÓN DE QUESO COTIJA**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

GONZÁLEZ TAHUILÁN NORMA ERIKA



MÉXICO, D. F.

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

“Deseo que toda tu vida sea amor, todo lo que hagas hazlo con amor, en cada pequeña cosa ve a Jesús y su ejemplo. Ofrece, todo lo que hagas con amor a Dios, inclusive las cosas más insignificantes de tu vida cotidiana”

Virgen María a Marija Medyugorje, Noviembre 1988

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias Señor y Madre mía por acompañarme a lo largo de este camino, porque aunque ha habido momentos difíciles no me han dejado caer. Gracias por llevarme de su mano y no soltarme jamás.

A mi madre, Sara Tahuilán, por todo su amor, cariño, comprensión, apoyo; por estar siempre a mi lado enseñandome y dandome ejemplo de responsabilidad, lucha, trabajo arduo, sacrificio y amor. Gracias *tesora* para ti son cada uno de estos logros, por que además de míos son tuyos por tu dedicación y entrega, te amo.

A mi padre, Rodolfo González, por proveer las armas necesarias para llegar a este punto, por darme ejemplo de responsabilidad.

A Fernando Ramírez Cahero por amor y cariño su apoyo en todo momento, por su; gracias por escucharme y confiar en mí. Tu ejemplo de entrega y profesionalismo siempre estará en mí.

A los miembros de mi familia (tías, hermana, primos, sobrinos, abuelitos) que me han ayudado de alguna manera, ya sea con una palabra, un consejo, una sonrisa, una lágrima. Gracias porque de todos ellos he aprendido.

A la Doctora Judith Jiménez Guzmán por asesorarme a lo largo de este trabajo, por su paciencia, por el aporte de su conocimiento, por recibirme siempre con una sonrisa.

Al Doctor Mariano García por la confianza puesta en mí para la realización de este trabajo.

A mis compañeros en el laboratorio especialmente a Luis Guillermo González por su paciencia al apoyarme en el trabajo de laboratorio.

A Lorena Borja, Blondie Virgen y Esmeralda Paz, que compartieron conmigo momentos inolvidables buenos y no tan buenos. Gracias por no olvidarse de mi, por apoyarme y enseñarme muchísimas cosas. Las quiero.

A Xelhua Eliuth Marcos por su amistad, apoyo, sinceridad y franqueza. Te quiero Xelhuis.

A mis amigas Alicia Mora y Cristal Álvarez gracias amiguitas las quiero mucho, gracias por brindarme su amistad, por su confianza y cariño.

A mis amigos Francisco, Polo, Joel, Carlos y Javier gracias por formar parte de esta historia, por su amistad.

<b>I RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>II INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>1 PROTEÍNAS DE LECHE</b> .....	<b>5</b>
1.1 <i>Caseínas</i> .....	5
1.2 <i>Proteínas del suero</i> .....	7
1.3 <i>Proteínas minoritarias</i> .....	7
<b>2 QUESO</b> .....	<b>7</b>
2.1 <i>Maduración del queso</i> .....	11
2.1.1 Factores que influyen en la maduración del queso .....	12
2.1.1.1 <i>Actividad del agua</i> .....	12
2.1.1.2 <i>Temperatura</i> .....	13
2.1.1.3 <i>pH</i> .....	14
2.2 <i>El proceso proteolítico en el queso</i> .....	14
2.2.1 Enzimas involucradas en la proteólisis del queso .....	15
2.2.1.1 <i>Enzimas naturales de la leche</i> .....	15
2.2.1.2 <i>Enzimas coagulantes</i> .....	16
2.2.1.3 <i>Enzimas proteolíticas provenientes de microorganismos</i> .....	17
2.2.1.3.1 <i>Enzimas de las bacterias lácticas</i> .....	18
2.2.1.3.1.1 <i>Sistema proteolítico de bacterias lácticas</i> .....	18
b) <i>Endopeptidasas</i> .....	20
c) <i>Aminopeptidasas</i> .....	21
d) <i>Peptidasas prolino-específicas</i> .....	21
e) <i>Enzimas de otras bacterias</i> .....	22
<b>3 QUESO COTIJA</b> .....	<b>22</b>
3.1 <i>Proceso de elaboración</i> .....	23
3.2 <i>Composición</i> .....	24
<b>4 PÉPTIDOS BIOACTIVOS</b> .....	<b>25</b>
4.1 <i>Péptidos opioides</i> .....	26
4.2 <i>Caseinofosfopéptidos</i> .....	28
4.3 <i>Péptidos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina I (ACE)</i> <i>Antihipertensivos</i> .....	29
4.4 <i>Péptidos inmunomoduladores</i> .....	29
4.5 <i>Péptidos antitrombóticos</i> .....	30
<b>5 PÉPTIDOS BIOACTIVOS EN QUESOS</b> .....	<b>33</b>
<b>III OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
<b>IV PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>38</b>
<b>1 DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>38</b>
1.1 <i>Análisis de las proteínas del suero</i> .....	38
1.2 <i>Análisis de las caseínas y péptidos</i> .....	38
<b>2 MUESTRAS</b> .....	<b>39</b>

<b>3</b>	<b>EXTRACCIÓN PROTEÍNAS SOLUBLES</b> .....	<b>40</b>
3.1	<i>Extracción con agua</i> .....	41
3.2	<i>Extracción con cloruros y acetato</i> .....	41
3.3	<i>Extracción con NaCl</i> .....	41
3.4	<i>Extracción con buffer de fosfatos</i> .....	41
3.5	<i>Extracción con citrato de Na</i> .....	41
<b>4</b>	<b>EXTRACCIÓN DE CASEÍNAS Y PÉPTIDOS</b> .....	<b>42</b>
4.1	<i>Extracción con urea</i> .....	42
<b>5</b>	<b>DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY</b> .....	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (NATIVA, SDS- Y TRIS-SDS)</b> .....	<b>43</b>
<b>V</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>45</b>
<b>1.</b>	<b>COMPROBACIÓN DEL PROCESO PROTEOLÍTICO EN EL QUESO COTIJA</b> .....	<b>45</b>
1.1	<i>Análisis de la hidrólisis de las proteínas del suero durante la maduración.</i> ..	54
1.2	<i>Análisis de las caseínas y de los péptidos a lo largo de la maduración del queso Cotija.</i> .....	66
<b>VI</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>91</b>
<b>VII</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>94</b>
<b>VIII</b>	<b>ANEXO</b> .....	<b>98</b>

## I RESUMEN

En las últimas décadas, la alimentación en México ha experimentado cambios importantes. La dieta, por ejemplo, se ha modificado volviéndose menos variada y equilibrada, sobrepasando en muchos casos la cantidad de nutrimentos necesarios para el adecuado funcionamiento del organismo. Lo anterior ha contribuido a un aumento en diversos problemas de salud entre los que se encuentran la obesidad, la hipertensión arterial, altos niveles de colesterol y triglicéridos en sangre, osteoporosis y problemas en el sistema digestivo; por lo que llevar a cabo acciones en el campo preventivo resulta de especial importancia y, en este rubro, los alimentos juegan un papel crítico, no solamente por su aporte nutrimental, sino porque algunos de ellos pueden actuar de manera terapéutica y/o preventiva; de esta forma se puede hablar de alimentos funcionales, que se definen como aquellos alimentos consumidos en la dieta que estimulan una o más funciones benéficas en el organismo.<sup>1</sup>

El objetivo del presente estudio fue comprobar si durante la maduración del queso Cotija ocurre una proteólisis que genere péptidos con algún tipo de actividad biológica.

En una etapa inicial, en cuatro muestras de queso, las cuales diferían en el estado de maduración y lugar de elaboración (dos quesos frescos, uno de ellos procedente de Hidalgo y el otro de Michoacán, y dos quesos maduros procedentes, cada uno, de los mismos estados), se determinó la concentración de proteína soluble (proteínas del suero y péptidos de alto y de bajo peso molecular) por el método de Lowry después de siete días de maduración, registrándose que la concentración de dichas proteínas aumentó en tres de las cuatro muestras analizadas;

simultáneamente se realizó el análisis de la hidrólisis de las proteínas del suero  $\beta$ -lg y SA mediante PAGE nativa, y se encontró que la concentración de ambas proteínas en todas las muestras disminuyó después de siete días de maduración, observando una mayor disminución para la SA, lo que permite sugerir que hay una mayor afinidad de las enzimas hacia la hidrólisis de dicha proteína.

En los quesos procedentes de Michoacán (queso fresco y queso maduro) el análisis se realizó a 5 y 21°C con la finalidad de analizar el efecto de la temperatura en la proteólisis. En general, a 21°C se observó un mayor aumento en la concentración de proteína soluble (PS), así como una mayor disminución en la concentración de las proteínas del suero analizadas ( $\beta$ -lg y SA) en comparación con el análisis realizado a 5 °C, proponiéndose así que la temperatura óptima de las enzimas involucradas en el proceso proteolítico en el queso está más cercana a 21°C que a 5°C.

Al comparar los quesos frescos y los maduros, se observó que en los primeros hubo mayor aumento en la cantidad de PS en comparación con los maduros. Para el caso de la SA y la  $\beta$ -lg en quesos frescos, se observó una disminución importante en la cantidad de ambas proteínas; en cuanto a los maduros, la disminución en la concentración de  $\beta$ -lg fue menor, y para el caso de la SA, su proteólisis se vio poco afectada debido a la baja humedad de estos quesos, detectándose similitudes con respecto a los quesos frescos.

En esta etapa inicial se registró la presencia de péptidos menores a 18 000 Da y una disminución de las proteínas de suero SA y  $\beta$ -lg.

En una segunda etapa se analizó la descomposición de las caseínas en la maduración del queso Cotija, determinando su concentración mediante el método de Lowry y PAGE. A partir de este momento, el proceso proteolítico se evaluó en muestras distintas a las de la primera etapa; para ello, se obtuvieron muestras de un mismo proveedor de Los Reyes, Michoacán, mismas que diferían en el grado de maduración; se contó con un queso fresco (menos de 10 días de elaboración), uno oreado (de uno a dos meses de elaboración) y uno maduro (más de tres meses de haber sido elaborado).

Ambas determinaciones revelaron que la concentración de caseína extraída aumentaba con la maduración del queso, infiriendo que la proteólisis provocó un incremento en la solubilidad de las caseínas; lo que tuvo como consecuencia un aumento en la cantidad de proteína extraída.

Con la finalidad de identificar y cuantificar los péptidos en cada etapa de la maduración del queso Cotija, el análisis de las muestras se llevó a cabo mediante electroforesis Tricina-SDS-PAGE. El peso molecular de los péptidos identificados se ubicó entre 416 y 4916 Da, registrándose una mayor concentración de éstos en el queso maduro, seguido del queso fresco, y la menor concentración en el queso oreado. Al considerar los péptidos menores a 1004 Da (la mayoría de los péptidos bioactivos son de bajo peso molecular), se observó que la concentración de éstos aumentaba con el grado de madurez. Durante la maduración se produjeron, en primer lugar, péptidos de alto peso molecular, para finalmente obtener péptidos de peso molecular bajo.

Se determinó el peso molecular de los péptidos encontrados en cada etapa de maduración, los cuales fueron relacionados -con base en su peso molecular- con aquellos que han sido informados como bioactivos en la leche y productos lácteos.

En el queso fresco se identificaron once péptidos: seis inmunomoduladores, seis antihipertensivos, dos antimicrobianos, un antitrombótico y un péptido acarreador de minerales.

En el queso oreado se encontraron once péptidos: seis antihipertensivos, dos acarreadores de minerales, dos opioides antagonistas, un péptido antitrombótico y uno inmunomodulador.

En cuanto a los péptidos encontrados en el queso maduro, nueve coinciden con péptidos bioactivos: cuatro opioides y uno más que es precursor de la  $\beta$ -casomorfina (un péptido opioide), dos inmunomoduladores, dos antihipertensivos, un antitrombótico, un antimicrobiano y un péptido acarreador de minerales.

## II INTRODUCCIÓN

La leche es un líquido blanco opaco de sabor dulce, el cual es secretado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos con la finalidad de alimentar al recién nacido.<sup>2</sup> El tipo de leche más ampliamente consumido alrededor del mundo es la leche proveniente de la vaca; su consumo se da desde los niños hasta los adultos mayores.

La leche de vaca es una emulsión -con un pH entre 6.5 y 6.7- de materia grasa en forma globular en un líquido constituido principalmente de agua, proteínas, lactosa, sales minerales y, en menor proporción, componentes como las lecitinas, vitaminas, enzimas, nucleótidos y gases disueltos.<sup>2,3</sup>

### 1 Proteínas de leche

La leche contiene aproximadamente 33 g proteína/L.<sup>4</sup>

El objeto de estudio en el presente trabajo fue analizar la descomposición de las proteínas durante la maduración del queso Cotija. Siendo el queso un producto derivado de la leche, se consideraron las proteínas presentes en ésta, las cuales pueden ser divididas en dos grupos principales: las caseínas y las proteínas del suero.

#### 1.1 Caseínas

Éstas constituyen aproximadamente el 80 % del total de las proteínas en la leche. Basándose en su composición, secuencia de aminoácidos y genotipos, las caseínas son clasificadas en cuatro diferentes fracciones:  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ .<sup>4, 5</sup>

Las caseínas son fosfoproteínas con pesos moleculares entre 20-25 kDa. Se encuentran en forma de micelas que, a su vez, están constituidas por submicelas. El núcleo de estas últimas está compuesto de  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$  y  $\beta$ -caseína, las cuales son notablemente hidrofóbicas. La  $\kappa$ -caseína es la responsable de estabilizar la micela, pues forma una capa hidrofílica alrededor del núcleo. Ésta se encuentra en cantidades variables principalmente en la superficie de la submicela; así, las submicelas deficientes de  $\kappa$ -caseína están localizadas en el centro de las micelas, mientras que las ricas están concentradas en la superficie.<sup>4, 6</sup>

Las submicelas están unidas entre sí por microcristales de fosfato de Ca, puentes de hidrógeno, y probablemente por enlaces hidrofóbicos.<sup>6</sup> Las caseínas existen como agregados coloidales. Una unidad de caseína completa está compuesta, en porcentaje en peso, aproximadamente por 40 % de  $\alpha$ -caseína, 35 % de  $\beta$ -caseína, 15 % de  $\kappa$ -caseína y 10 % de componentes minoritarios.<sup>2, 7</sup>

Todas las caseínas, especialmente la  $\beta$ , tienen altos niveles de prolina, que evita la formación de estructuras secundarias y terciarias; lo que tiene como consecuencia que sean más susceptibles a la proteólisis. Este hecho juega un papel muy importante en la maduración del queso.<sup>6</sup>

Las  $\gamma$  caseínas son componentes minoritarios del sistema de las caseínas. Se trata de fragmentos del extremo C- terminal de la  $\beta$ -caseína producidos por la acción de la plasmina. El fragmento N-terminal de la  $\beta$ -caseína es conocido como fracción proteosa-peptona.<sup>6</sup>

## 1.2 Proteínas del suero

El suero de la leche contiene aproximadamente 0.6 % de proteínas, constituidas por  $\beta$ -lactoglobulina (54 %),  $\alpha$ -lactoalbúmina (21 %), seroalbúmina (10 %) y por inmunoglobulinas y otras proteínas.

Las proteínas del suero son proteínas globulares que se encuentran libres en solución acuosa, presentan estructuras cuaternarias, son insensibles al  $\text{Ca}^{2+}$  y no están fosforiladas.<sup>4, 6</sup>

## 1.3 Proteínas minoritarias

La leche contiene diversas proteínas minoritarias, las cuales se encuentran principalmente en el suero; entre ellas destacan enzimas, inhibidores de enzimas, factores de crecimiento, así como proteínas que ligan vitaminas y metales.<sup>6</sup>

## 2 Queso

El consumo de leche de vaca es generalizado alrededor del mundo. Ésta, además de ser ingerida como tal, se consume en forma de productos derivados de ella; algunos de los principales son leches fermentadas, mantequilla, yogurt y quesos. De especial interés para este trabajo es el queso.

Un queso se define como un producto elaborado con la cuajada de la leche obtenida por coagulación de la caseína con o sin tratamiento ulterior de calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin la adición de fermentos de maduración; dando como resultado, de acuerdo con su proceso de elaboración, queso fresco, madurado o procesado.

Las especificaciones de la leche, su origen y vía por la cual se lleva a cabo la coagulación de la caseína dependen de la variedad de queso.<sup>8</sup>

La transformación de la leche en queso consta de cuatro etapas principales:

i) Coagulación

Comprende modificaciones físicas y químicas de la micela de caseína debido a la acción de enzimas proteolíticas y/o ácido láctico, lo que conduce a la formación de un entramado proteico llamado coágulo. La enzima coagulante mejor conocida es el cuajo bovino (una mezcla de quimosina y pepsina), que es excretada en el estómago de los rumiantes lactantes. El cuajo, en la fase enzimática, hidroliza la  $\kappa$ -caseína en el enlace peptídico Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub>, liberando hacia el suero el fragmento 106-169 llamado caseinomacropéptido, que posee un carácter ácido e hidrofílico; el fragmento 1-105, llamado para- $\kappa$ -caseína, que posee un carácter básico e hidrofóbico, permanece ligado a las caseínas  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$  y  $\beta$  integrado dentro de la micela. La acción estabilizadora de la  $\kappa$ -caseína resulta de la interacción del caseinomacropéptido de la proteína intacta con la solución circundante.<sup>4, 9</sup>

En la fase de coagulación ocurre la formación del gel por asociación de las micelas de caseína modificadas. La liberación del caseinomacropéptido al suero implica disminución de la carga y del grado de hidratación de las micelas; de esta forma los dos factores de estabilidad se ven afectados, estableciéndose entonces enlaces intermoleculares que conducen a la formación del gel. La agregación del gel comienza hasta que el 85-90 % de la  $\kappa$ -caseína ha sido hidrolizada.<sup>9</sup>

## ii) Desuerado

En toda la superficie del coágulo se observa una exudación espontánea en forma de pequeñas gotas de lactosuero, las cuales van creciendo y uniéndose para constituir una cubierta líquida alrededor del mismo. Dicho fenómeno, durante el cual se concentra el coágulo por eliminación de agua y de constituyentes solubles, se denomina sinéresis. Para obtener el queso, el lactosuero debe ser separado de la cuajada, ya sea por decantación o filtración. Al conjunto de las operaciones de sinéresis y evacuación del lactosuero se le denomina desuerado.<sup>9</sup>

Una finalidad del desuerado es obtener una cuajada con la cantidad de agua deseada y regularizar la cantidad de calcio retenida. Este proceso determina en gran parte las propiedades físicas de la cuajada y ejerce un papel importante en la maduración del queso. Otra finalidad es la de regularizar la cantidad de lactosa y de sus productos de transformación y, de esta manera, regularizar también la acidez de la cuajada, misma que determina la cantidad de calcio presente. Además, la reducción progresiva del agua de hidratación permite la formación de diferentes tipos de enlaces entre los agregados micelares, siendo los primeros que se forman los enlaces hidrofóbicos, los cuales, al ser cada vez más numerosos, provocan la contracción del coágulo y la expulsión del lactosuero.<sup>9</sup>

Durante el proceso de coagulación se producen reordenaciones moleculares, que desenmascaran grupos activos entre los que se establecen enlaces, especialmente a través de cationes divalentes como el calcio. Por otra parte, los aminoácidos azufrados permanecen en la para- $\kappa$ -caseína, siendo posible la formación de puentes disulfuro entre las moléculas proteicas, lo que representa la etapa final

de la sinéresis.<sup>9</sup> Finalmente, la cantidad de agua que se elimina varía de acuerdo con el tipo de queso que se esté elaborando, y va de menos de 30 % a más de 85 %.<sup>7</sup>

### iii) Salado

Es la incorporación de sal, ya sea en la superficie del queso o en su masa, o bien, mediante la inmersión de éste en salmuera. La función del salado es la de completar el desuerado, pues favorece el drenaje del agua libre de la cuajada. El salado también produce cambios en la solubilidad, hidratación, y probablemente en la conformación de las proteínas del queso, lo que influye en su textura. El NaCl inhibe el desarrollo de los microorganismos, así como la actividad de varias enzimas. A ello se debe su influencia durante la maduración del queso; por otro lado, aporta sabor y puede enmascarar aquellos de algunas sustancias que aparecen durante la maduración.<sup>9</sup>

Según el tipo de queso y la forma de conservación se observa una variación en el contenido de NaCl; la mayoría contiene entre 1 y 2 %, existiendo algunos tipos que pueden presentar de 8 a 15 %.<sup>7, 9</sup>

### iii) Maduración

La maduración es el conjunto de transformaciones bioquímicas de los constituyentes de la cuajada por efecto de enzimas, la mayoría de ellas de origen microbiano.<sup>9</sup>

## 2.1 Maduración del queso

La etapa más relevante para el presente trabajo fue la degradación de las proteínas durante la maduración del queso Cotija.

La maduración es la fase de digestión enzimática de la cuajada, la cual está constituida principalmente por caseínas, materia grasa y componentes solubles. Durante esta fase, dichos componentes son transformados, modificándose la estructura, composición, aspecto, consistencia y color de la cuajada, acentuándose finalmente su sabor y aroma.<sup>9</sup>

Las enzimas responsables de dichas transformaciones tienen diversos orígenes: pueden provenir de la leche, del cuajo y/o de los microorganismos presentes en el queso. Éstos, a su vez, pueden provenir de la leche, de fermentos empleados, de la salmuera, de la atmósfera del lugar en donde se elabora y madura el queso y del material empleado en su elaboración.

La gran variedad de microorganismos existentes está relacionada con la diversidad de productos obtenidos en las reacciones enzimáticas durante la maduración del queso. Tales productos pueden dar lugar a la formación de nuevos compuestos, mismos que pueden ser transformados por otros sistemas enzimáticos.<sup>9</sup>

Durante la maduración, la microbiota presente en el queso cambia: unas especies se desarrollan mientras que otras desaparecen. En la maduración del queso las principales reacciones son la fermentación de la lactosa, la hidrólisis de proteínas y la degradación de la materia grasa.<sup>9</sup>

### 2.1.1 Factores que influyen en la maduración del queso

Durante la maduración del queso se llevan a cabo diferentes reacciones enzimáticas, principalmente de origen microbiano (ver 2.2.1).<sup>9</sup>

#### 2.1.1.1 Actividad del agua (aw)

El aw es un factor muy importante en el desarrollo de los microorganismos y en la actividad enzimática, ya que influye de manera determinante en la maduración del queso. La mayoría de las bacterias requieren un aw  $\approx$  0.92 para crecer. En los quesos, el aw está determinado por dos parámetros principales: el contenido de agua y el contenido de sal, sin embargo, existen diferentes factores que pueden modificarlo: <sup>6,9</sup>

1. La pérdida de humedad por evaporación, debido a que la superficie del queso está expuesta a la atmósfera, siendo mucho mayores las variaciones en quesos grandes que en los pequeños.
2. El aumento en el contenido de nitrógeno soluble durante la maduración, en virtud de que los péptidos y aminoácidos producidos ligan agua.
3. La hidrólisis de proteínas a péptidos y aminoácidos durante la maduración, puesto que una molécula de agua se adiciona a cada enlace hidrolizado.

La disminución del aw da como resultado una baja actividad enzimática; por esa razón los quesos húmedos se maduran más rápidamente que los quesos muy desuerados.<sup>9</sup>

### 2.1.1.2 Temperatura

La temperatura es un factor determinante para el crecimiento microbiano y la actividad enzimática. La temperatura puede modificar la configuración tridimensional de las proteínas y afectar así los índices de actividad enzimática. Tanto para los microorganismos como para las enzimas existe una temperatura óptima, es decir, la temperatura a la cual se registra la mayor velocidad de crecimiento microbiano así como la mayor actividad enzimática.<sup>9, 10</sup>

Las temperaturas óptimas de desarrollo de los microorganismos se ubican entre 20 y 25 °C para los mohos, levaduras y micrococos; entre 30 y 35 °C para las bacterias lácticas mesófilas, y entre 40 y 45 °C para las especies termófilas. En cuanto a las enzimas, la máxima actividad de las lipasas se registra entre 30 y 35°C, y entre 40 y 45 °C para las proteasas. Sin embargo, las temperaturas de maduración en los quesos son muy inferiores, situándose entre 5 y 20 °C, y son generalmente más bajas mientras más húmedos son los quesos.<sup>9, 10</sup>

La temperatura a la cual se madura un queso está determinada por dos requerimientos opuestos: 1) la necesidad de controlar el crecimiento de bacterias patógenas, y así evitar la transmisión de enfermedades, y 2) la necesidad de promover las reacciones enzimáticas durante la maduración y el crecimiento de la microbiota secundaria.<sup>6</sup> Las temperaturas elevadas promueven una maduración más rápida, no obstante, favorecen el crecimiento de bacterias contaminantes.<sup>6</sup>

### 2.1.1.3 pH

El efecto del pH sobre el crecimiento microbiano se debe en gran parte a la naturaleza de las proteínas, ya que la interacción de las cargas de los grupos R de los aminoácidos en las cadenas polipeptídicas influye mucho en su estructura y función.<sup>10</sup> Por ello, la actividad enzimática es muy susceptible a las variaciones de pH, por ejemplo, por debajo de 4.5 la estabilidad y actividad de numerosas enzimas se reduce drásticamente. En el caso de las proteasas microbianas, la mayoría de ellas presentan una actividad máxima en el intervalo de pH de 5 a 7.5, mientras que la actividad máxima de las lipasas se presenta en el intervalo de 7.5 a 9. En ese sentido, la influencia del pH es determinante, pues únicamente las bacterias lácticas, las levaduras y los mohos pueden desarrollarse a pH inferiores a 5.<sup>9</sup>

## 2.2 El proceso proteolítico en el queso

Las principales proteínas del queso son las caseínas. Éstas constituyen su matriz puesto que representan alrededor del 99 % de las proteínas totales en la mayoría de ellos,<sup>5</sup> y son precursoras de productos más simples (secundarios): péptidos, aminoácidos, aminas, ácidos, tioles y tioésteres; los cuales juegan un papel importante tanto en la textura como en el sabor.<sup>11</sup> Asimismo, son precursoras de algunos péptidos que presentan actividad biológica.

Las proteínas del suero constituyen el 1 % del total de proteínas en la mayoría de los quesos. Éstas quedan inicialmente atrapadas en la cuajada, pero, debido a su solubilidad, una alta proporción es arrastrada en el suero al cortar la cuajada. Las proteínas que permanecen retenidas contribuyen al cuerpo del queso,

al mismo tiempo que constituyen un reservorio de aminoácidos para el desarrollo del sabor y aroma, aunado a que sirven de sustrato para las bacterias.<sup>5, 7</sup>

La proteólisis en el queso puede ser dividida en tres fases: 1) la que ocurre antes de que la leche sea procesada, 2) la enzimática, que es inducida por la coagulación de la leche y cultivos iniciadores, y 3) la proteólisis durante la maduración del queso.<sup>11</sup>

### 2.2.1 Enzimas involucradas en la proteólisis del queso

Los principales agentes involucrados en la proteólisis son las enzimas nativas de la leche, las cuales son particularmente importantes en quesos elaborados con leche bronca; las enzimas del cuajo (quimosina, pepsina o proteasas microbianas); las enzimas de los cultivos iniciadores, y las de los cultivos no iniciadores, mismos que están conformados por microorganismos que sobrevivieron a la pasteurización o que se introdujeron en la leche pasteurizada o en la cuajada durante el proceso de elaboración, y que, al morir, liberan sus enzimas.<sup>11</sup>

Las enzimas de origen microbiano desempeñan el papel más importante en la maduración, ya que la cantidad de microorganismos en el queso es elevada, especialmente en aquellos elaborados con leche cruda,<sup>11</sup> como es el caso del Cotija.

#### 2.2.1.1 Enzimas naturales de la leche<sup>9</sup>

La actividad proteolítica nativa de la leche involucra la presencia de al menos dos enzimas, las cuales se encuentran asociadas a la micela de caseína: la plasmina y la proteasa ácida.

- La plasmina, una proteasa alcalina, es el principal componente del sistema proteolítico nativo de la leche; pertenece al grupo de las serina proteasas, rompe enlaces Lys-X y degrada preferentemente la caseína  $\beta$ . Esta enzima está relacionada con la formación de las caseínas  $\gamma$  y de la fracción proteosa-peptona. Su acción genera pequeñas cantidades de aminoácidos y de péptidos solubles.
- La proteasa ácida realiza su actividad preferentemente sobre la caseína  $\alpha_{S1}$ ; su actividad a lo largo de la maduración se manifiesta en quesos de pasta prensada y de maduración lenta.
- Las fosfatasas podrían intervenir desfosforilando las caseínas y los fosfopéptidos, permitiendo que sean más fácilmente hidrolizables para las enzimas proteolíticas.

#### 2.2.1.2 Enzimas coagulantes

Las enzimas coagulantes son endopeptidasas del grupo de las carboxipeptidasas. Éstas presentan actividad tanto en la primera etapa de fabricación del queso, en donde la  $\kappa$ -caseína es hidrolizada, como a lo largo de la maduración, en donde hay una actividad proteolítica general sobre todas las caseínas.

A lo largo del desuerado, una parte de la enzima coagulante es evacuada con el lactosuero y otra es retenida en la cuajada. Si bien la cantidad de cuajo retenida es baja, es suficiente para que las proteasas jueguen un papel importante en la maduración del queso.<sup>9</sup>

El cuajo es una mezcla de quimosina (80 %) y pepsina (20 %). La primera rompe preferentemente los enlaces entre aminoácidos hidrofóbicos, en particular

entre leucina y fenilalanina. In Vitro se ha observado que la quimosina ejerce una acción proteolítica general sobre las caseínas  $\alpha_{S1}$  y  $\beta$  durante la maduración. En la caseína  $\alpha_{S1}$ , dos enlaces son más susceptibles: Phe<sub>23</sub>-Phe<sub>24</sub> y Phe<sub>24</sub>-Val<sub>25</sub>, dando lugar la correspondiente ruptura al péptido  $\alpha_{S1 II}$ . Esta proteólisis continúa a lo largo de la maduración, dando como resultado la disminución de la concentración de la caseína  $\alpha_{S1}$  y el aumento del péptido  $\alpha_{S1 II}$ .<sup>9</sup>

En cuanto a la degradación de la caseína  $\beta$ , este proceso ocurre en forma secuencial a partir de la zona C- Terminal, siendo los enlaces Leu<sub>192</sub>-Tyr<sub>193</sub> y Ala<sub>189</sub>-Phe<sub>190</sub> los más susceptibles de ser hidrolizados.<sup>9</sup>

La acción del cuajo juega un papel importante en la degradación de las proteínas a lo largo de la maduración. Los péptidos liberados son principalmente de elevado peso molecular, y en el caso de los aminoácidos, la cantidad liberada es prácticamente nula.<sup>9</sup>

#### 2.2.1.3 Enzimas proteolíticas provenientes de microorganismos

A lo largo de la maduración, los microorganismos liberan en la cuajada enzimas exocelulares y enzimas intracelulares, que son liberadas hasta después de la lisis o muerte de las células.<sup>9</sup>

Las enzimas proteolíticas se subdividen en dos grupos: las endopeptidasas (proteasas), que hidrolizan las proteínas produciendo péptidos, y las exopeptidasas (aminopeptidasas, dipeptidasas, carboxipeptidasas), que rompen péptidos originando aminoácidos.

### 2.2.1.3.1 Enzimas de las bacterias lácticas (LAB)

#### 2.2.1.3.1.1 Sistema proteolítico de bacterias lácticas.

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos auxótrofos, por lo tanto, su crecimiento depende de su eficiencia para degradar moléculas grandes como las proteínas así como de su capacidad para transportar moléculas menores (péptidos y aminoácidos). En particular, poseen sistemas proteolíticos altamente específicos que pueden generar péptidos únicos.<sup>14</sup>

Las enzimas de las LAB ejercen una actividad endopeptidásica sensiblemente más baja que la del cuajo. En los quesos producen apreciables cantidades de N soluble, principalmente péptidos de cadena corta y aminoácidos. Los péptidos liberados por el cuajo, tanto de elevado como de bajo peso molecular, son hidrolizados por las LAB y degradados a aminoácidos y a péptidos de cadena corta. Por ello se dice que la acción de las LAB es complementaria a la del cuajo. Finalmente, el tipo de producto liberado depende de la naturaleza de las enzimas involucradas.<sup>9</sup>

Las distintas especies de LAB presentan diferencias en su sistema proteolítico:

Los lactobacilos poseen un equipo enzimático variado especialmente rico en exopeptidasas; los lactobacilos termófilos parecen poseer dos sistemas proteolíticos, uno periplásmico de naturaleza endopeptidásica y otro citoplásmico, de carácter exopeptidásico. Las especies mesófilas poseen una actividad proteolítica de naturaleza esencialmente exopeptidásica ligada a su estructura interna.<sup>9</sup> Por su parte, los estreptococos lácticos poseen enzimas proteolíticas intracelulares o ligadas

a sus paredes, cuya actividad es sensible y varía según las cepas. Esta variabilidad tiene gran repercusión en la fabricación de los quesos.<sup>9</sup>

La cascada de reacciones proteolíticas que tienen lugar durante el crecimiento de lactococos y lactobacilos en la leche comienza con la acción de endopeptidasas exocelulares; éstas liberan péptidos de caseína de tamaño variable, mismos que son sustratos de otras peptidasas que los transforman en péptidos más pequeños y/o aminoácidos. Al parecer, muchas de estas peptidasas están localizadas en el interior de las células, siendo una consecuencia de ello que el rompimiento proteolítico final ocurra después del transporte de los péptidos al interior.<sup>14</sup>

A su vez, las diversas especies de LAB presentan una gran actividad proteolítica: se han encontrado proteasas proline específicas, oligopeptidasas, tripeptidasas, dipeptidasas, aminopeptidasas de elevada especificidad, prolineaminopeptidasas y carboxipeptidasas. Asimismo, se han descubierto mecanismos encargados del transporte de aminoácidos y péptidos.<sup>9, 14</sup>

#### a) Proteasas

Las proteasas liberadas de células de *L. lactis* y *Lactobacillus paracasei* tienen muchas características y propiedades comunes:<sup>15</sup>

1. Pueden clasificarse como serina proteasas.
2. Tienen un tamaño de aproximadamente 110-150 kDa.
3. Su actividad es dependiente de iones calcio (que en altas concentraciones actúa como inhibidor).

4. Generan diferentes productos de degradación, mismos que determinan el crecimiento de las bacterias lácticas en la leche y contribuyen a la formación de sabores en los productos lácteos fermentados.

Las proteasas de *L. lactis* han sido clasificadas en dos grupos: el tipo PI y el tipo PIII; a su vez, se ha clasificado un grupo con la especificidad de ambos, PI/PIII. El tipo PI, representado por la proteasa de *L. lactis* de la cepa HP, degrada preferentemente la  $\beta$ -caseína y, en mucho menor medida, la  $\alpha$ - y  $\kappa$ -caseína. Dichas proteasas tienen preferencia por aminoácidos con carga positiva.

El tipo PIII, que se encuentra en cepas AM1 y SK11 de *L. lactis*, degrada la  $\alpha$ ,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseína. Al parecer, este tipo de proteasas actúan sobre las cargas negativas localizadas en el extremo N-terminal.

La mezcla de proteasas tipo PI/PIII se encuentra en varias cepas de *L. lactis*, tales como NCD0763 y la UC317.

Así, las proteasas de lactococos son capaces de producir péptidos pequeños de caseína, evitando que ocurra una posterior hidrólisis dentro de la célula.<sup>14</sup>

#### b) Endopeptidasas

En lactococos, las endopeptidasas están localizadas dentro de la célula, exceptuando a la endopeptidasa extracelular NisP, la cual se encuentra asociada a la síntesis de nisina, un péptido antimicrobiano producido por algunas cepas de *L. lactis*, mismo que se encuentra en su membrana celular.<sup>14</sup>

*L. lactis* NCD0763 presenta una endopeptidasa cuyo peso molecular es 93 000 Da. Esta enzima degrada muy lentamente la  $\beta$ -caseína a un pH óptimo de 7.5 a 44 °C, y tiene una especificidad similar a la de otras metalo-proteasas intracelulares aisladas de *L. lactis* y *Streptococcus thermophilus*.<sup>14</sup>

#### c) Aminopeptidasas

Aparentemente en todas las bacterias lácticas hay aminopeptidasas comunes que presentan actividad de tipo carboxipeptidasa.

Se han aislado algunas aminopeptidasas de ciertas cepas de *L. lactis* y de otros lactobacilos, cuatro de las cuales han sido identificadas y caracterizadas bioquímica y genéticamente. Tales enzimas son las aminopeptidasas A, la pirrolidonil carboxilil peptidasa, las aminopeptidasas N y las aminopeptidasas C; mientras que las dos primeras tienen sustratos específicos muy comunes; las otras tienden a utilizar sustratos más específicos y a degradar, además, amino acil-p-nitroanilidas y di, tri y tetrapéptidos.<sup>14</sup>

#### d) Peptidasas prolino-específicas

Para liberar oligopéptidos ricos en prolina a partir de caseína, se requiere la presencia de LAB con peptidasas prolino-específicas. Estas enzimas (prolino aminopeptidasa, prolinasa, iminodipeptidasa y X-prolil dipeptidil aminopeptidasa), han sido detectadas en especies de LAB como *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus helveticus*.<sup>14</sup>

e) Enzimas de otras bacterias

En *Micrococcus caseolyticus*, las enzimas intracelulares están adaptadas para degradar la caseína que fue modificada por acción del cuajo. Ciertas cepas de este microorganismo poseen una metaloproteasa exocelular muy activa frente a las caseínas no degradadas, especialmente sobre la caseína  $\beta$ .<sup>9</sup>

En las bacterias propiónicas se ha detectado actividad caseinolítica ligada a la pared celular y actividad peptidásica intracelular.<sup>9</sup>

En *S. faecalis* se produce una proteasa exocelular. En cuanto a *Enterococcus faecium* y *Enterococcus durans*, ambos están dotados de una actividad intracelular comparable a la de los estreptococos lácticos.<sup>9</sup>

En *Brevibacterium linens* se han encontrado proteasas exo e intracelulares.<sup>9</sup>

### **3 Queso Cotija**

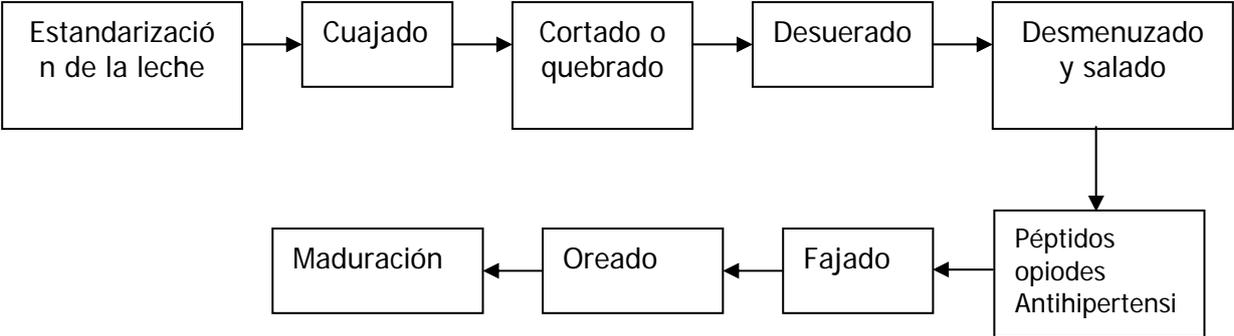
En el presente estudio se analizó la evolución de las proteínas del Queso Cotija durante su maduración. La razón del empleo de este queso es que se trata de uno de los quesos mexicanos genuinos más conocidos, el cual goza de gran popularidad y aceptación entre los consumidores nacionales. Éste puede clasificarse como un queso de pasta dura, prensada, no cocida, madurada; elaborado con leche cruda de vaca de ganado criollo, entera o ligeramente descremada; presenta forma cilíndrica con un peso de 20 a 30 kg y posee una pasta friable (desmoronable) con un elevado porcentaje de sal; cuando está maduro presenta un color blanco-amarillento agradable, así como un sabor y aroma muy pronunciados.<sup>12</sup> Este queso se elabora

principalmente durante la época de lluvias, cuando las condiciones permiten que el ganado sea alimentado por libre pastoreo.

Otra razón de la utilización de queso Cotija es que tiene un pH y una actividad acuosa bajos en comparación con otros quesos mexicanos, lo que limita el crecimiento de microorganismos, evitándose así problemas de contaminación durante la maduración.<sup>13</sup>

### 3.1 Proceso de elaboración

Existen diversos procesos de elaboración del queso Cotija, según el estado, la región y el quesero; sin embargo, se puede hablar de un proceso general de elaboración:<sup>12</sup>



Aunque este proceso implica una etapa de maduración larga ( $\geq 100$  días), muchos productores lo comercializan a los pocos días de ser elaborado.

La maduración comienza desde el oreo, que ocurre al exponer el queso a temperatura ambiente durante varios días; y posteriormente, se permite que continúe el proceso, ya sea en una cámara de refrigeración o manteniendo el queso en un lugar fresco.<sup>12</sup>

Un queso Cotija genuino debe ser madurado al menos durante 100 días, siendo preferible que la maduración se lleve a cabo por varios meses. Este proceso debe realizarse en un lugar en el que se tenga control de la temperatura y de la humedad relativa a fin de prevenir un crecimiento microbiano indeseable o una maduración heterogénea.<sup>12</sup>

### 3.2 Composición

La composición del queso Cotija varía de acuerdo con el proceso de elaboración, tal como se muestra en la tabla 1, en donde las tres composiciones corresponden a tres diferentes productores.<sup>12</sup>

**Tabla 1.** Composición del queso Cotija correspondiente a tres diferentes productores.

<b>Productor</b>	<b>Humedad</b> %	<b>Sólidos totales</b> %	<b>Grasa</b> %	<b>Proteína</b> %	<b>Cenizas</b> %	<b>Cloruros</b> %
1	37.3	62.6	24	28.8	6.45	4.11
2	38.2	61.7	22.8	28.2	8.26	4.63
3	37.9	62	25	28.5	7.73	4.58

Existe variabilidad entre los quesos Cotija elaborados entre una región y otra debido a que no se cuenta con un proceso único para su elaboración; de igual forma no se cuenta con una norma oficial mexicana para este producto.

De especial interés en el presente estudio es la proteólisis que ocurre en la maduración del queso Cotija, ya que se desea saber si ésta conduce a la liberación de péptidos con actividad biológica.

## 4 Péptidos bioactivos

Diversos estudios se han enfocado a la investigación de sustancias bioactivas procedentes de los alimentos. Entre ellos destacan los realizados en leche, cuyas proteínas: caseínas (principalmente) y proteínas del suero, mediante proteólisis enzimática, producen péptidos biológicamente activos.<sup>16</sup>

Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos que presentan una actividad biológica determinada. No obstante, muchas de estas sustancias son inactivas cuando forman parte de una proteína, y únicamente cuando han sido liberados de éstas, ya sea mediante proteólisis química o enzimática, tanto in vivo como in Vitro, manifiestan su actividad. Dentro de las actividades biológicas informadas se encuentran las siguientes: actividad antimicrobiana; antioxidante; antitrombótica; actividad acarreadora de minerales; inmunomoduladora; antihipertensiva; y opioide agonista, y antagonista.<sup>16-18</sup>

Los péptidos bioactivos pueden interactuar con sitios blanco en el lado luminal del tracto intestinal o, bien, alcanzar cualquier sitio potencial en algún sistema y provocar sus efectos fisiológicos.<sup>26</sup>

La proteólisis es probablemente el evento bioquímico más importante durante la maduración de la mayoría de los quesos. Durante ésta, las proteínas son degradadas a productos primarios y posteriormente a secundarios.<sup>11</sup>

En la leche, las proteínas  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ -caseína son las principales precursoras de péptidos bioactivos, aun cuando la mayoría de ellas tienen poca bioactividad o incluso no la presentan en su estado natural, su digestión enzimática

libera péptidos con actividad biológica.<sup>19</sup> Por su parte, la  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina, seroalbúmina y lactoferrina, que son proteínas del suero, representan una menor proporción en la leche.<sup>4</sup>

Con excepción de la  $\alpha$ -lactoalbúmina y la lactoferrina, las cuales presentan actividad en su estado natural, las proteínas del suero pueden liberar, mediante proteólisis enzimática, péptidos con actividad biológica.<sup>19</sup> En cuanto a la cantidad de péptidos bioactivos generados a partir de estas proteínas, se ha informado una menor proporción de éstos en comparación con los péptidos bioactivos generados a partir de las caseínas.

Las enzimas proteolíticas que se encuentran naturalmente en la leche y/o los productos lácteos, y las enzimas de las LAB o de fuentes exógenas, contribuyen a la generación de estos péptidos.<sup>20, 21</sup>

#### 4.1 Péptidos opioides <sup>16, 18, 19, 21-24</sup>

Los péptidos opioides son exorfinas o formonas (hormonas de los alimentos) que poseen propiedades farmacológicas similares al opio (morfina). Los derivados de la  $\alpha$ - y  $\beta$ -caseína (casomorfina), así como las lactorfina procedentes de la  $\alpha$ -lactoalbúmina, ejercen respuesta agonista ; los fragmentos derivados de la  $\kappa$ -caseína (casoquininas), al igual que la lactoferroxina (proveniente de la lactoferrina), se comportan como opioides antagonistas. Estos péptidos pueden producir efecto analgésico; tener influencia en el metabolismo posprandial mediante la estimulación de la secreción de insulina y somatostatina; influir sobre la absorción de nutrimentos, ya que prolongan el tránsito gastrointestinal; ejercer una actividad antidiarreica; y

modular el transporte de aminoácidos. Los péptidos opioides presentes en los productos lácteos juegan un papel activo en el sistema nervioso produciendo efectos como la inducción del sueño, depresión respiratoria, bradicardia e hipotensión; así, un aumento en la cantidad de  $\beta$ -casomorfina y morficeptina en leches infantiles predigeridas disminuye el llanto e incrementa el sueño en los bebés.

La característica estructural común entre los péptidos opioides endógenos y exógenos es la presencia de una tirosina en la parte amino terminal (excepto en péptidos opioides procedentes de la  $\alpha$ -caseína) y la presencia de aminoácidos aromáticos como Phe y Tyr en la tercera o cuarta posición. La carga negativa de la tirosina parece ser esencial para la actividad opioide. La carencia de este residuo provoca la ausencia total de bioactividad. Asimismo, un residuo de prolina es crucial para la bioactividad de los péptidos opioides, pues mantiene la orientación apropiada de las cadenas laterales de Phe y Tyr.

En el caso de las mujeres embarazadas o en estado de lactancia, las  $\beta$ -casomorfinas producidas en la leche pasan a través del tejido mamario y posiblemente influyen en la liberación de prolactina y oxitocina.

El efecto de las dietas de caseína en la movilidad del tracto intestinal sugiere que la actividad opioide agonista de las casomorfinas prevalece sobre la actividad antagonista de las casoquininas o de las lactoferroxinas; sin embargo, la ingestión de leche con alto contenido de lactoferrina y bajo contenido de caseína, condición que ocurre durante y después de la mastitis, podría incrementar la cantidad de casokininas y lactoferroxina sobre las  $\beta$ -casomorfinas, aumentando de esta manera la velocidad del paso gastrointestinal y reduciendo el tiempo disponible para que los

patógenos colonicen el tracto gastrointestinal del lactante. Las casomorfinas son conocidas por su capacidad para modular la absorción de iones y aminoácidos por el epitelio intestinal.

#### 4.2 Caseinofosfopéptidos<sup>18, 19, 21, 25, 26</sup>

La leche y los productos lácteos proporcionan calcio en abundancia, el cual puede formar complejos solubles con los caseinofosfopéptidos, evitando la precipitación del fosfato de calcio, con lo que aumenta la absorción intestinal de este mineral y su retención en el cuerpo. Se ha demostrado que los caseinofosfopéptidos son capaces de enlazar macroelementos como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ , así como oligoelementos:  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Se}^{2+}$ ; por tanto, funcionan como acarreadores de minerales y pueden ser usados en el tratamiento de raquitismo.

La mayoría de los caseinofosfopéptidos comparten una característica común: están constituidos por una secuencia de tres residuos fosfoserilo seguidos por dos de ácido glutámico (SerP-SerP-SerP-Glu-Glu). Estos péptidos resisten la proteólisis en el intestino ya que poseen una alta concentración de cargas negativas por los aminoácidos fosfatados, los cuales constituyen el sitio de enlace para los minerales. Los caseinofosfopéptidos, especialmente los provenientes de la  $\alpha$ -caseína, tienen una alta capacidad de ligar  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  y de aumentar, así, la cantidad de ambos en el epitelio intestinal.

Por otra parte, se ha demostrado que el calcio ligado a los caseinofosfopéptidos puede presentar un efecto anticariogénico, inhibiendo la caries a través de la recalcificación del esmalte dental.

#### 4.3 Péptidos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina I (ACE). Antihipertensivos.<sup>18, 21, 22, 24</sup>

Son péptidos provenientes de la  $\alpha_{S1}$  y  $\beta$  caseínas, así como de la  $\beta$ -lactoglobulina, que inhiben a la enzima convertidora de angiotensina I (ACE), mostrando un efecto antihipertensivo. En el sistema renina-angiotensina, la proteasa aspártica renina hidroliza el angiotensinógeno, liberando el decapeptido angiotensina I; la ACE hidroliza la angiotensina I al octapeptido angiotensina II, el cual es un vasoconstrictor (aumenta la presión sanguínea). La angiotensina II también inactiva a la bradiquinina (un péptido que actúa como vasodilatador) e incrementa la producción de aldosterona, que disminuye la excreción renal de fluidos y sales aumentando la retención de agua y el volumen de fluidos extracelulares.

Se ha encontrado que la mayor actividad inhibidora de la ACE se debe a los péptidos derivados de la  $\alpha_{S1}$  caseína.

Los péptidos inhibidores de la ACE derivados de los productos lácteos no son tan potentes como las drogas comúnmente usadas para los tratamientos de hipertensión, sin embargo, pueden ser auxiliares al incluirlos en la dieta.

#### 4.4 Péptidos inmunomoduladores<sup>19, 21, 24</sup>

Los péptidos inmunomoduladores provenientes de la leche estimulan la proliferación y maduración de las células T en el sistema inmune. Así, pueden actuar en defensa del recién nacido contra un gran número de bacterias, particularmente entéricas. Los inmunopéptidos obtenidos de la  $\alpha_{S1}$ ,  $\beta$ -caseína y  $\alpha$ -lactoalbúmina estimulan la

actividad de los macrófagos humanos. En ratones presentan un efecto protector contra la infección de *Klebsiella pneumnoniae*.

En particular, los péptidos inmunomoduladores de la caseína tienen la capacidad de aumentar la fagocitosis y modular la proliferación y diferenciación de los linfocitos.

Un grupo de péptidos derivados de la caseína que puede estar implicado en la estimulación del sistema inmune son los péptidos inhibidores de la ACE, los cuales impiden la liberación del octapéptido angiotensina II, que inactiva la bradiquinina. Esta última es capaz de estimular a los macrófagos y aumentar la migración de los linfocitos; por lo tanto, los inhibidores de la ACE podrían favorecer la actividad de bradiquinina y actuar así como inmunomoduladores.

El efecto inmunomodulador de las proteínas del suero, principalmente de la  $\alpha$ -lactoalbúmina y la  $\beta$ -lactoglobulina, ha sido atribuido a su alto contenido en aminoácidos azufrados (cisteína y metionina) y a su participación en la síntesis de glutatión. La lactoferricina proveniente de la lactoferrina bovina tiene una actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram-negativas y contra *Candida albicans*. Por su parte, la lactoferrina y su péptido N-terminal modulan la blastogénesis de los linfocitos.

#### 4.5 Péptidos antitrombóticos<sup>18, 21, 25</sup>

Las casoplatelinas son péptidos derivados de la  $\kappa$ -caseína que inhiben tanto la agregación de las plaquetas como la unión de la cadena  $\gamma$  del fibrinógeno humano a la región receptora específica en la superficie de la plaqueta. El mecanismo

involucrado en la coagulación de la leche, definido como la interacción de la  $\kappa$ -caseína con la enzima coagulante, y aquel involucrado en la coagulación de la sangre, definido como la interacción del fibrinógeno con la trombina, son de naturaleza similar. La región de interacción de la cadena  $\gamma$  del fibrinógeno humano en la agregación de las plaquetas es la parte del C-terminal de este dodecapéptido (f 400-411), el cual posee efectos inhibidores similares al undecapéptido 106-116 proveniente de la  $\kappa$ -caseína. En éste, tres residuos de aminoácidos (Ile 108, Lys 112 y Asp 115) se encuentran en posición homóloga comparados con la cadena  $\gamma$  de la secuencia del fibrinógeno humano. Dichos residuos parecen ser importantes para el efecto inhibidor de la agregación de las plaquetas, mismo que resulta de la competencia entre los péptidos antitrombóticos y la cadena  $\gamma$  del fibrinógeno por los receptores de plaquetas.

#### 4.6 Péptidos bioactivos en productos lácteos

Los péptidos bioactivos presentes en los productos lácteos se generan durante el proceso de elaboración, principalmente mediante proteólisis enzimática.<sup>18, 20</sup> Entre los principales productos en los que se ha informado la presencia de péptidos bioactivos se encuentran la leche y sus hidrolizados, las leches fermentadas y los quesos.<sup>21</sup>

##### 4.6.1 Leche y sus hidrolizados

En la leche se han observado diversas bioactividades: funciones hormonales; de factores de crecimiento; actividad moduladora de las funciones digestivas y

gastrointestinales, así como actividad moduladora hemodinámica con efectos potenciales en el tracto gastrointestinal.<sup>21</sup>

En hidrolizados incubados con varias especies bacterianas, incluyendo LAB, se han identificado  $\beta$ -casomorfina con efecto inmunomodulador; en otros casos se han encontrado péptidos bioactivos con efecto antitrombótico producidos enzimáticamente por digestión con tripsina del caseinomacropéptido y de la  $\beta$ -caseína hidrolizada con quimosina.<sup>21</sup>

#### 4.6.2 Leches fermentadas

En leches fermentadas, uno de los principales factores que influye en la síntesis de péptidos bioactivos son los cultivos iniciadores; así, se ha informado la presencia de péptidos con actividad antihipertensiva en leches fermentadas con *Lactobacillus helveticus*.<sup>21</sup>

De una leche fermentada con *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cereviceae* de origen japonés llamada "Calpis" se purificaron péptidos inhibidores de la ACE,<sup>21</sup> los cuales disminuyeron la presión arterial sistólica después de 6-8 horas de su administración.<sup>22</sup> Algunos de los efectos probióticos atribuidos a las cepas LAB están relacionados con la síntesis específica de péptidos bioactivos; la producción de éstos podría explicar parcialmente las propiedades probióticas atribuidas a la cepa de *Lactobacillus GG*, ya que en leche fermentada con esta cepa con posterior digestión con pepsina y tripsina se ha observado la presencia de péptidos bioactivos con actividad inmunomoduladora y opioide así como actividad inhibidora de la ACE. En

yogurt se han encontrado péptidos en el rango de 500-10 000 Da, los cuales reducen, in Vitro, el riesgo de cáncer de colón.<sup>21</sup>

## **5 Péptidos bioactivos en quesos**

El queso experimenta una serie de cambios complejos durante la maduración,<sup>26</sup> siendo la proteólisis uno de los eventos más importantes. Durante esta última se lleva a cabo la descomposición de proteínas a compuestos simples como péptidos y aminoácidos,<sup>11</sup> que son productos naturales de la maduración del queso. Las especies bacterianas involucradas en la maduración pueden provenir de la leche, de las enzimas del cuajo, de las proteasas microbianas de LAB utilizadas como cultivos iniciadores y de otros microorganismos presentes en la cuajada.<sup>26</sup> Las LAB usadas como microorganismos iniciadores en los productos lácteos y la microflora endógena de la leche poseen un sistema proteolítico que incluye proteasas ligadas a la célula (PLC) y proteasas intracelulares.

Las PLC liberan diferentes oligopéptidos que son hidrolizados por las peptidasas en fragmentos más cortos, así como en aminoácidos, contribuyendo todos ellos al sabor de los quesos.<sup>20</sup>

Los sistemas proteolíticos de las bacterias empleadas en la producción de queso pueden contribuir a la liberación de péptidos bioactivos o sus precursores. La degradación de los últimos por exo y endo peptidasas de LAB puede conducir a la producción de diferentes péptidos bioactivos que, al fomentar ciertas funciones fisiológicas o reducir el riesgo de enfermedades, pueden ser considerados como componentes auxiliares en la salud.<sup>26, 28</sup>

Resultados de diversos estudios sugieren que la concentración de péptidos bioactivos aumenta paralelamente con la maduración del queso y empieza a disminuir cuando la proteólisis excede cierto nivel.<sup>28</sup> El patrón de péptidos, especialmente en el rango de bajo peso molecular, es claramente dependiente del tiempo de maduración, la temperatura, el proceso de elaboración, el contenido de agua y sal,<sup>26</sup> así como del tipo de microorganismos iniciadores utilizados.<sup>20</sup>

Una gran variedad de péptidos son liberados durante la maduración del queso; muchos de ellos han mostrado tener actividad biológica. En diversos quesos maduros se ha informado la presencia de péptidos de bajo peso molecular que poseen actividad inhibidora de la ACE.<sup>20</sup> La proteólisis incrementa dicha actividad,<sup>20</sup> la cual es resultado de una mezcla compleja de péptidos solubles de bajo peso molecular,<sup>26 29</sup> sin embargo, esto ocurre sólo a cierto nivel, después del cual la actividad inhibidora disminuye.<sup>20</sup>

Se ha observado que la actividad inhibidora de la ACE en queso Gouda con un estado de maduración medio es aproximadamente el doble que en queso Gouda con un tiempo de maduración prolongado.<sup>20</sup>

En queso Parmesano madurado durante 6 meses se observó la presencia de un péptido antihipertensivo derivado de la  $\alpha_{s1}$ , el cual no fue detectado después de 15 meses de maduración.

En queso Manchego se registró que la actividad antihipertensiva disminuía en los cuatro primeros meses de maduración y que era máxima a los 8 meses, disminuyendo otra vez hacia los 12.<sup>18</sup>

Péptidos inhibidores de la ACE han sido aislados de varios quesos italianos caracterizados por un periodo corto o medio de maduración (Crescenza e Itálico). En queso Crescenza y Cheddar se ha aislado el péptido f 58-72 de la  $\beta$ -caseína, el cual contiene la secuencia de la  $\beta$ -casomorfina 7, que es un péptido antihipertensivo.<sup>20</sup>

En quesos Italianos (Itálico y Gorgonzola) se aislaron péptidos que presentaron actividad inhibidora de la ACE.<sup>18</sup>

En queso Crescenza se aisló un péptido proveniente de la  $\beta$ -caseína que inhibe diversas enzimas, entre las que se encontraba la ACE.<sup>21</sup> En ciertos quesos italianos: Gouda, Emmental, Blue, Camembert, Edam, Havarti, se evaluó la actividad inhibidora de la ACE y la actividad hipotensiva,<sup>26, 29</sup> observándose mayor efecto inhibitor, tanto in Vitro como in vivo, en queso Gouda con 8 meses de maduración. Dos péptidos [ $\alpha_{S1}$ -caseína (f 1-9),  $\beta$ -caseína (f 60-68)] mostraron potente actividad inhibidora de la ACE,<sup>21</sup> así como un efecto depresivo más fuerte de la presión arterial. En queso Emmental se identificaron 91 péptidos, 28 de los cuales mostraron, in Vitro, diferentes bioactividades; entre ellas, antihipertensivas, acarreadoras de minerales, antimicrobianas e inmunomoduladoras.<sup>21</sup>

Se ha observado efecto opioide en queso Cheddar con seis meses de maduración; éste contiene un péptido que presenta esta actividad ( $\beta$ -caseína f 60-68), el cual es parte de la  $\beta$ -casomorfina-11. De igual forma, en queso Parmesano, diversos péptidos que contienen secuencias de  $\beta$ -casomorfina han sido identificados.<sup>26</sup> Además, recientemente se detectó actividad moderada de casoquinina ( $\beta$ -caseína f 58-72 y  $\beta$ -caseína f 193/194-209) en extractos solubles en agua de queso Norvegia (Tipo Gouda).<sup>26, 29</sup>

Los fosfopéptidos son constituyentes naturales en los quesos,<sup>27, 28</sup> sin embargo, en algunos casos se ha observado una mayor concentración, tal es el caso del queso Gouda fresco. Cabe señalar que las enzimas proteolíticas de las LAB producen caseinofosfopéptidos durante la maduración de los quesos de “pasta cocida” como el Comté o el Grana Pagano.<sup>18, 20</sup>

Se ha encontrado que péptidos provenientes de queso Gouda inhiben la proliferación de células de leucemia; asimismo, los péptidos derivados de un queso sin denominación de origen en el que se utilizó *Lactococcus lactis subsp lactis* como cultivo iniciador presentaron efectos anticarcinogénicos.<sup>27</sup>

Entre los estudios dedicados al desarrollo de productos lácteos funcionales se encuentra el realizado en el Agrifood Research Centre, en Finlandia, en el que, variando la temperatura y el tiempo de maduración así como adicionando al cultivo iniciador *Lactobacillus acidophilus* y bifidobacterias, se desarrolló un queso tipo Gouda con un bajo contenido de grasa y un sabor “fuerte”, el cual se denominó “Festivo”; en éste se encontró que durante la maduración hubo producción de péptidos bioactivos con efecto potencial antihipertensivo, detectándose que la actividad inhibidora de la ACE aumenta durante la maduración y disminuye cuando la proteólisis excede un cierto nivel durante el tiempo de almacenamiento; lo anterior sugiere que este queso podría tener un impacto benéfico en la salud.<sup>28</sup>

### **III OBJETIVOS**

#### General

Evaluar la maduración del queso Cotija para determinar si durante ella se da una proteólisis que libere péptidos con una probable actividad biológica.

#### Particulares

Establecer un método adecuado para la extracción de proteínas y péptidos en queso Cotija.

Comprobar si durante la maduración del queso Cotija se lleva a cabo un proceso proteolítico a temperatura ambiente y de refrigeración.

Verificar la presencia de péptidos a lo largo de la maduración.

Comparar, con base en su tamaño, los péptidos encontrados en queso Cotija con los informados en la bibliografía y sugerir una posible actividad biológica.

## **IV PARTE EXPERIMENTAL**

### **1 Diseño experimental**

#### 1.1 Análisis de las proteínas del suero.

Se evaluó la degradación de las proteínas solubles (proteínas del suero, péptidos de peso molecular elevado y péptidos de cadena corta) al inicio y a los siete días de maduración en cuatro muestras de queso Cotija que diferían en el lugar de elaboración y en el grado de madurez (Tabla 2), las cuales fueron almacenadas a dos diferentes temperaturas: 5 y 21 °C. Después de su recepción, cada muestra se dividió en fragmentos de 100 g. Los quesos evaluados a 5 °C fueron refrigerados, mientras que los evaluados a 21 °C (temperatura ambiente) se guardaron en envases de plástico que fueron cerrados y colocados en recipientes de unicel, con la finalidad de evitar variaciones de temperatura. En este último caso, la temperatura se mantuvo prácticamente constante durante el tiempo de monitoreo (con una variación aproximada de  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). El análisis se realizó mediante el método de Lowry y de electroforesis PAGE nativa.

#### 1.2 Análisis de las caseínas y péptidos

La degradación de las caseínas a lo largo de la maduración del queso Cotija, así como de los péptidos presentes en las diferentes etapas de maduración, se evaluó en tres muestras de queso que diferían en su grado de madurez. Las muestras fueron almacenadas a 5 °C después de su recepción. La degradación de las caseínas se determinó mediante el método de Lowry y por electroforesis SDS-PAGE, mientras que los péptidos fueron analizados mediante electroforesis Tris-SDS-PAGE.

## 2 Muestras

Para la elección del método de extracción de proteínas del suero, la muestra utilizada fue un Queso Cotija comercial cuyo estado de maduración se desconocía. Se trataba de un queso seco de color amarillo pálido.

**Tabla 2.** Muestras de queso Cotija utilizadas para el análisis de proteínas del suero.

<b>Muestras</b>	<b>Características</b>
Queso Cotija fresco (Michoacán)	Textura suave, color amarillo pálido
Queso Cotija maduro (Michoacán)	Rígido, color amarillo pálido
Queso Cotija fresco (Hidalgo)	Elaborado con leche pasteurizada, textura suave, color amarillo
Queso Cotija maduro (Hidalgo)	Elaborado con leche pasteurizada, ligeramente seco, de textura suave, color amarillo

Para evaluar la hidrólisis de las proteínas a lo largo de la maduración y la liberación de péptidos como consecuencia de ésta, se adquirieron tres muestras de queso Cotija que diferían en el estado de maduración, las cuales se consiguieron en Los Reyes, Michoacán (todas con el mismo proveedor para reducir la variabilidad entre ellas) y fueron denominadas de acuerdo con lo informado por el productor: queso oreado, queso fresco y queso maduro (tabla 3).

**Tabla 3.** Muestras de queso Cotija utilizadas para el análisis de caseínas y péptidos.

<b>Muestras</b>	<b>Características</b>
Queso Cotija fresco.	Color blanco-amarillento, con menos de 10 días de elaboración.
Queso Cotija oreado	Color amarillento, con 2 a 4 semanas de elaboración.
Queso Cotija maduro	Color amarillento, con más de tres meses de elaboración.

### **3 Extracción proteínas solubles<sup>11, 33</sup>**

Reactivos:

- Agua destilada y desionizada
- Ácido acético (marca Baker)
- Ácido clorhídrico (Baker)
- Acetato de sodio (Baker)
- Buffer de fosfatos de pH 7 (Baker)
- Citrato de sodio (Baker)
- Cloruro de sodio (Baker)
- Cloruro de calcio (Baker)

Para la elección del método de extracción de proteínas solubles se trabajó con el queso Cotija comercial, al cual se le aplicaron los cinco métodos de extracción descritos enseguida (3.1-3.5).

Cuando se estableció qué método se utilizaría, se extrajeron las proteínas de las muestras procedentes de Hidalgo y de Michoacán. En cada caso, 5 gramos de queso fueron homogeneizados con 25 mL de las soluciones utilizadas en la extracción durante 5 minutos en un mortero, filtrándose posteriormente el sobrenadante.

### 3.1 Extracción con agua

En este caso se usó agua destilada y desionizada.

### 3.2 Extracción con cloruros y acetato

La solución empleada tenía la siguiente composición (p/v): 23.08 % de ácido acético, 54.5 % de acetato de sodio  $\cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$ , 18.83 % de NaCl y 3.57 % de  $\text{CaCl}_2$  anhidro.

### 3.3 Extracción con NaCl

La solución empleada fue NaCl al 5%.

De igual forma, en los siguientes métodos de extracción se homogeneizaron 5g de queso, sin embargo, el pH de las soluciones se ajustó a 4.4 con HCl con la finalidad de precipitar las caseínas presentes en la solución.

### 3.4 Extracción con buffer de fosfatos

Se utilizó buffer de fosfatos de pH= 7.

### 3.5 Extracción con citrato de Na

La solución empleada fue citrato de sodio 0.5 M.

## **4 Extracción de caseínas y péptidos**<sup>34</sup>

### 4.1 Extracción con urea

Reactivos:

- Agua destilada y desionizada
- Urea

Material:

- Membrana para diálisis (Sigma Chemical)

En este método, 0.6 g de queso fueron homogeneizados en 12.5 mL de urea 8M (pH=8), con posterior incubación en baño de agua a 37 °C por 2 horas; a continuación se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 minutos a 4 °C y se filtró; después se dializó durante 24 horas a 5 °C en una solución de buffer de fosfatos (pH=7) con una membrana que retiene proteínas de 12,000 Da o mayores.

Para el caso de la extracción de péptidos se omitió la diálisis con la finalidad de evitar su pérdida.

## **5 Determinación de la cantidad de proteínas por el método de Lowry (Anexo)**<sup>32</sup>

Reactivos:

- Reactivo A  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Baker) al 2 % en NaOH 0.1 N (Baker)
- Reactivo B  $\text{CuSO}_4$  al 1 % (Baker)
- Reactivo C  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$  al 2 % (Baker)
- Reactivo D Reactivo de Folin 1:1 (Hycel)
- Agua destilada

Material:

- Espectrofotómetro UV-visible Shimadzu UV-160

## **6 Electroforesis en gel de poliacrilamida (nativa, SDS- y Tris-SDS)**

**(Anexo)<sup>30, 40</sup>**

Reactivos:

- Agua destilada y desionizada
- Ácido acético (Baker)
- HCl (Baker)
- Glicerol (Baker)
- Metanol (Baker)
- Acrilamida (marca Bio-Rad)
- N', N'-bis-metilenacrilamida (Bio-Rad)
- Azul de bromofenol (Bio-Rad)
- Azul de Coomassie (Bio-Rad)
- Tris (Bio-Rad)
- Persulfato de amonio al 10%(Bio-Rad)
- SDS al 10% (Bio-Rad)
- TEMED (tetrametiletilendiamina) (Bio-Rad)
- Colorante Sypro (Bio-Rad)
- Seroalbúmina
- $\beta$ -lactoglobulina

Estándares utilizados:

- Soluciones de 1 mg/mL de seroalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina
- Solución de 1 mg/mL de caseína (Hammarsten, Merck)

- Estándar de peso molecular para SDS-PAGE amplio rango (Bio-Rad) (Anexo)
- Estándar de polipéptidos para SDS-PAGE (Bio-Rad) (Anexo)

Material:

- Equipo de electroforesis Mini-PROTEAN II (Bio-Rad)
- Analizador Gel Doc 1000 Fluorescent Imaging System (Bio-Rad)

## V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Comprobación del proceso proteolítico en el queso Cotija

En esta primera etapa se requería verificar la existencia de un proceso proteolítico durante la maduración del queso Cotija. Para ello se evaluó la variación en la cantidad de proteínas solubles (PS) después de siete días de maduración a dos diferentes temperaturas (5 y 21 °C) en un queso comercial tipo Cotija del cual se desconocía el estado de maduración. Un aumento en la cantidad de proteína soluble podría relacionarse con la existencia de un proceso proteolítico.

Se evaluaron cinco métodos de extracción de PS con la finalidad de elegir uno que permitiera extraer la mayor cantidad de proteína. Ésta se midió por el método de Lowry. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.

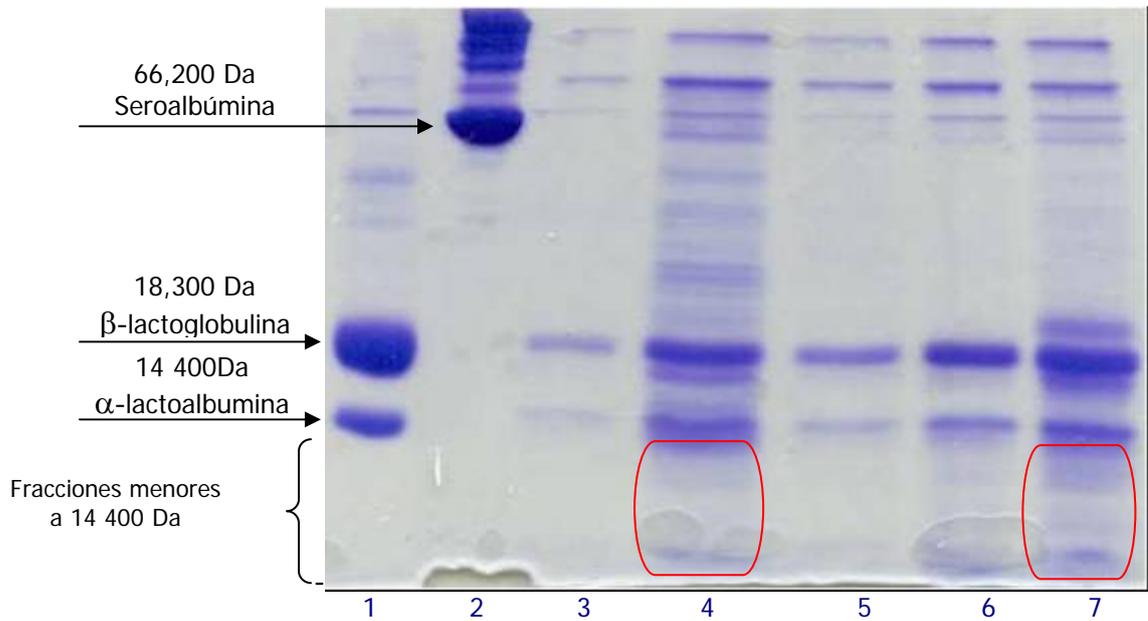
**Tabla 4.** Concentración de PS en cada uno de los métodos de extracción evaluados.

<b>Método de extracción</b>	<b>Proteína extraída %(p/p)</b>
NaCl	2.46
Agua	2.18
Buffer fosfatos	1.69
Citrato de sodio	1.39
Cloruros y acetato	1.12

Se observó que el método que extraía mayor cantidad de PS era la extracción con NaCl, sin embargo, la cantidad de proteína observada en cada uno de los métodos evaluados fue poca (tabla 4). Para llevar a cabo el análisis de PS en la maduración del queso Cotija fue necesario elegir un método que permitiera extraer tanto la mayor cantidad como la mayor variedad de proteínas. De esta forma los cinco métodos fueron evaluados mediante electroforesis nativa en gel de

poliacrilamida (PAGE nativa), mediante la cual se obtuvo el tipo de proteínas presentes en cada extracto. Los resultados se muestran en la figura 1.

En dicha electroforesis se observó que los métodos con buffer de fosfatos y citrato de sodio (Figura 1, carriles 4 y 7) eran los más eficientes para realizar la extracción con respecto a los métodos en que se usaba NaCl, agua y cloruros/acetatos. En los dos primeros casos se observó mayor intensidad en las bandas, misma que es proporcional a la concentración de las proteínas presentes. En esta electroforesis se advierte la presencia de  $\alpha$ -lactoalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina y seroalbúmina (proteínas del suero), así como de fracciones más pequeñas (mostradas en recuadro en la Figura 1), probablemente péptidos. Las caseínas no fueron observadas en este gel.



**Figura 1.** PAGE nativa T 12.5%. **Elección del método de extracción.** **1.**  $\beta$ -lactoglobulina (1 mg/mL); **2.** Seroalbúmina (1 mg/mL); **3.** Método de extracción con agua; **4.** Método de extracción con buffer de fosfatos; **5.** Método de extracción con cloruros y acetato; **6.** Método de extracción con cloruro de sodio, y **7.** Método de extracción con citrato de sodio.

Como una primera aproximación para determinar si en el queso Cotija ya maduro ocurría un proceso proteolítico, se llevó a cabo el análisis de PS en queso madurado durante siete días a dos diferentes temperaturas. Para el análisis se contó con cuatro muestras que diferían en el tiempo de maduración así como en el lugar de elaboración: un queso fresco y uno maduro procedentes de Michoacán y otros dos quesos, uno fresco y otro maduro, procedentes de Hidalgo.

La cantidad de PS extraída por los métodos seleccionados fue determinada en las diferentes muestras a 5 y 21 °C al inicio y al cabo de 7 días de maduración. En los quesos procedentes de Hidalgo, únicamente se llevó a cabo la maduración a temperatura de refrigeración (5°C), debido a que al madurarlos a temperatura

ambiente (21°C) presentaron contaminación por hongos, por lo que esas muestras fueron desechadas.

En la determinación de concentración de proteína soluble al inicio de la maduración (día cero) en las muestras de queso, se observó que la extracción de PS realizada con buffer de fosfatos era mayor que la cantidad de proteína extraída con citrato de sodio. Debido a lo anterior, el análisis se realizó utilizando únicamente las proteínas extraídas con buffer de fosfatos.

En la tabla 5 se aprecia que en los quesos frescos la cantidad de PS aumenta desde el inicio hasta el día siete de maduración a las dos temperaturas, observándose un mayor efecto a 21 °C que a 5 °C; esto podría estar relacionado con la temperatura de actividad óptima de las enzimas presentes, la cual aumentó con la temperatura.

**Tabla 5.** Cantidad de proteína soluble extraída en quesos frescos de diferente origen a dos temperaturas de maduración.

<b>Origen</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Inicio</b> mg proteína extraída /g queso	<b>Después de siete días de maduración</b> mg proteína extraída /g queso	<b>Incremento</b> %
Michoacán	5	8.848	12.531	41.62
	21		13.636	54.11
Hidalgo	5	10.483	12.987	23.88

Con respecto a los quesos maduros (tabla 6), se aprecia que la concentración de PS aumenta en el queso procedente de Hidalgo, mientras que en el procedente de Michoacán disminuye ligeramente después de los siete días de

maduración a 5 y 21 °C. Cabe señalar que se desconocía la fecha exacta de elaboración del queso originario de Michoacán, sin embargo, de acuerdo con sus características, se puede suponer que era un queso maduro (tabla 2).

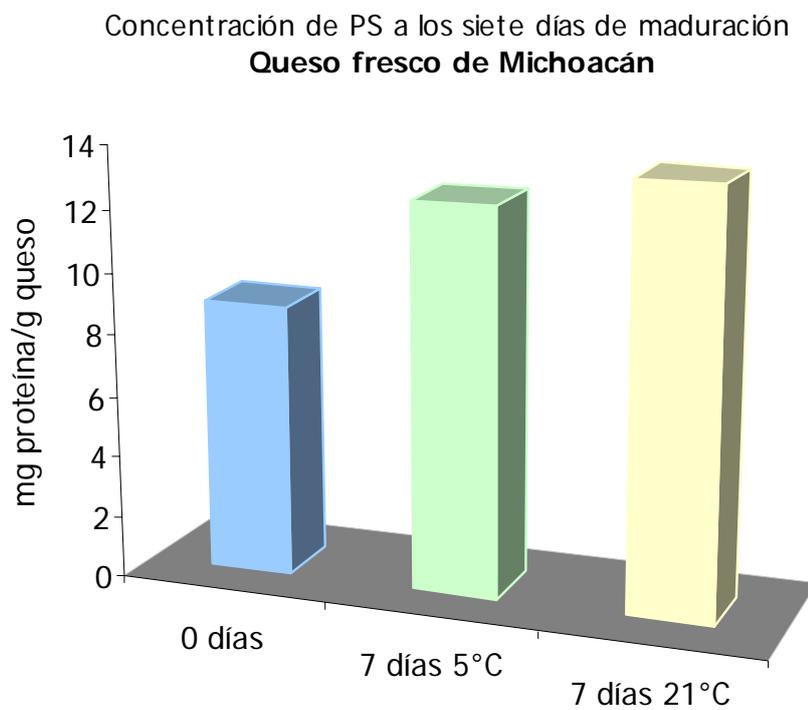
Durante la maduración del queso, su superficie está expuesta a la atmósfera y éste pierde humedad; así, el aw se modifica y, por ende, la actividad enzimática disminuye.<sup>9</sup> Considerando lo anterior, para el queso maduro procedente de Michoacán puede decirse que la concentración de proteína soluble no se modificó.

**Tabla 6.** Cantidad de proteína en quesos maduros de diferente origen a dos temperaturas de maduración.

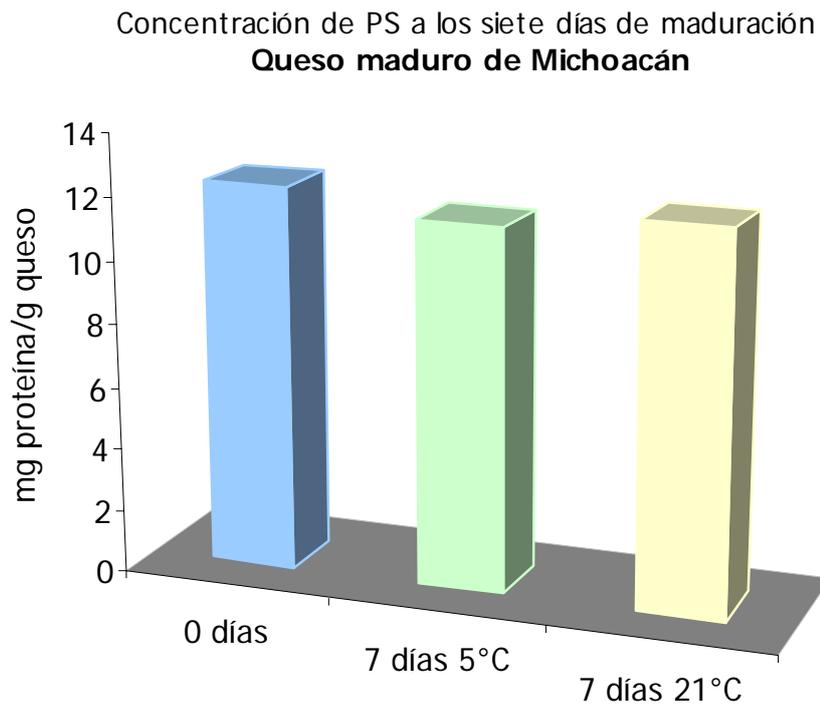
<b>Origen</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Inicio mg proteína extraída /g queso</b>	<b>Después de siete días de maduración mg proteína extraída /g queso</b>	<b>Incremento %</b>
Michoacán	5	12.280	11.514	-
	21		12.030	-
Hidalgo	5	17.775	20.073	12.92

- = no hay incremento de proteína

Las figuras 2, 3, 4 y 5 muestran la cantidad de PS en los quesos procedentes de Michoacán e Hidalgo tanto frescos como maduros; siendo más evidente el aumento de proteína soluble en los quesos frescos (figuras 2 y 4) que en los maduros (figuras 3 y 5).

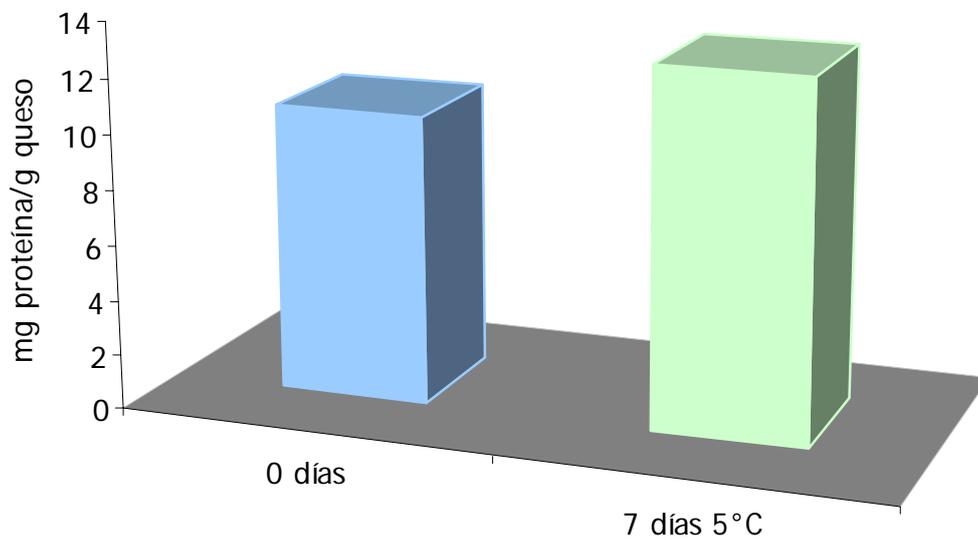


**Figura 2.** Concentración de proteína soluble en queso Cotija fresco procedente de Michoacán. La barra azul representa la concentración al inicio de la maduración (8.848 mg proteína/g queso); la verde a los siete días a 5 °C (12.531 mg proteína/g queso), y la amarilla a los siete días a 21 °C (13.636 mg proteína/g queso).

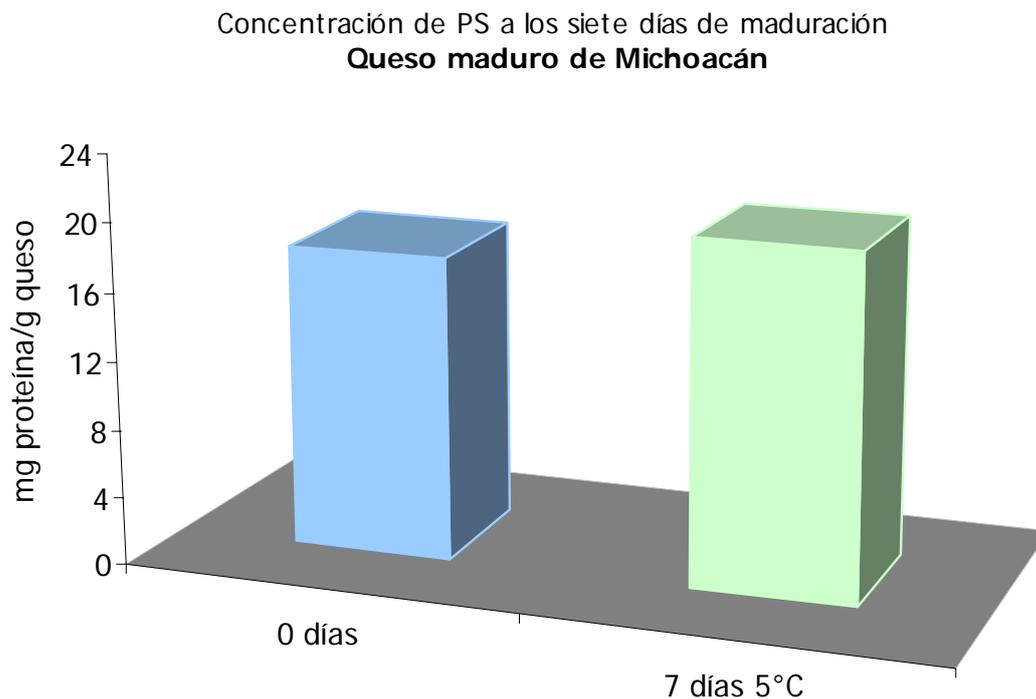


**Figura 3.** Concentración de proteína soluble en queso Cotija maduro procedente de Michoacán. La barra azul representa la concentración al inicio de la maduración (12.280 mg proteína/g queso); la verde a los siete días a 5 °C (11.514 mg proteína/g queso), y la amarilla a los siete días a 21 °C (12.030 mg proteína/g queso).

Concentración de PS a los siete días de maduración  
**Queso fresco de Hidalgo**



**Figura 4.** Concentración de proteína soluble en queso Cotija fresco procedente de Hidalgo. La barra azul representa la concentración al inicio de la maduración (10.483 mg proteína/g queso), y la verde a los siete días a 5°C (12.987 mg proteína/g queso).



**Figura 5.** Concentración de proteína soluble en queso Cotija maduro procedente de Hidalgo. La barra azul representa la concentración al inicio de la maduración (17.775 mg proteína/g queso), y la verde a los siete días a 5°C (20.073 mg proteína/g queso).

En el queso Cotija fresco procedente de Michoacán, que fue madurado a 5 y 21°C, se pudo apreciar la influencia de la temperatura sobre el proceso proteolítico. Al comparar la cantidad de PS extraída a cada temperatura se observó que en la muestra madurada a 21 °C el aumento de PS fue mayor que a 5°C; lo anterior sugiere que la temperatura óptima de las enzimas involucradas en la descomposición de las proteínas en este queso está más cercana a 21 °C; por lo tanto, existe mayor actividad proteolítica a esta temperatura.

Durante la etapa de maduración, el queso pierde gradualmente humedad hasta equilibrar el aw de su superficie con la humedad relativa del ambiente.<sup>9</sup> El aw en el queso es uno de los principales factores que afecta al proceso proteolítico. En particular, si éste disminuye, también lo hace la actividad enzimática. Entre los factores que determinan el aw en el queso se encuentran el contenido de NaCl y la cantidad de compuestos nitrogenados solubles generados durante la maduración.<sup>9</sup>

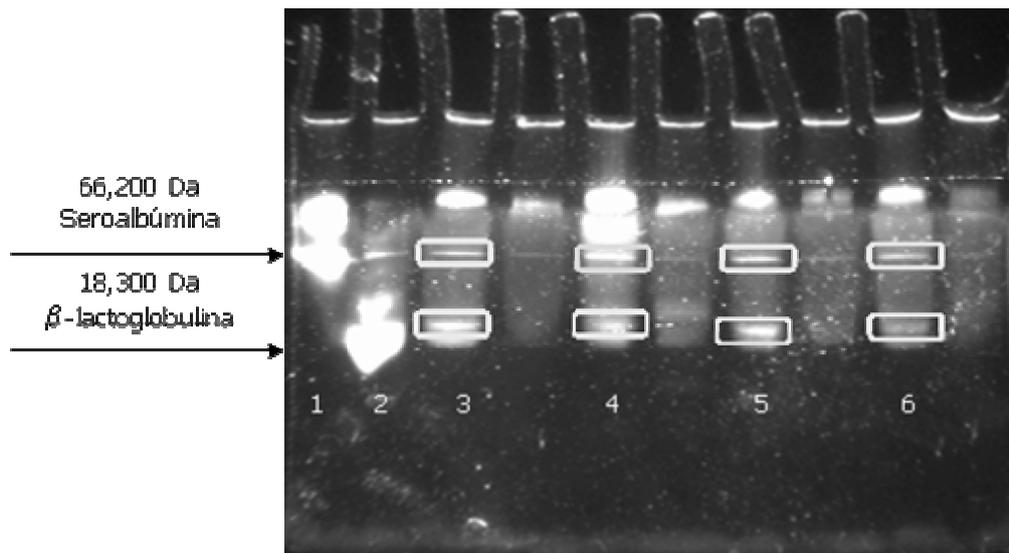
En los quesos frescos tanto de Michoacán como de Hidalgo (Figuras 2 y 4) se observa un mayor incremento en la cantidad de PS después de los siete días de maduración en comparación con los quesos maduros (Figuras 3 y 5), en los cuales el cambio en la cantidad de PS es menos notorio. Lo anterior podría explicarse por la cantidad de agua presente en cada uno de los quesos. Así, conforme avanza la maduración, la cantidad de agua necesaria para que se lleven a cabo las reacciones enzimáticas disminuye. Debido a la pérdida de humedad durante el proceso, la concentración de sal aumenta, al igual que la de compuestos nitrogenados solubles debido a la proteólisis; todo esto provoca que la actividad enzimática disminuya y, por tanto, que la proteólisis ocurra más lentamente.

#### 1.1 Hidrólisis de las proteínas del suero durante la maduración.

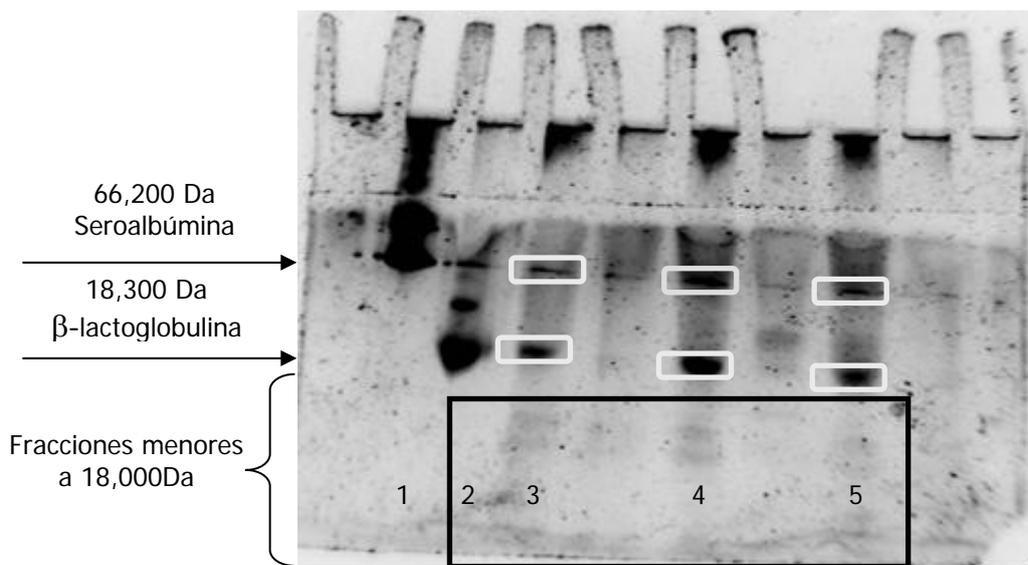
Además de la determinación de la cantidad de PS, se realizó un análisis de la descomposición de las proteínas del suero mediante PAGE nativa. Las muestras analizadas mediante electroforesis fueron aquellas extraídas con buffer de fosfatos, tomando como patrón para la identificación soluciones de  $\beta$ -lactoglobulina y seroalbúmina.

Al realizar el análisis de los geles, se observó que la intensidad en las bandas representativas de  $\beta$ -lactoglobulina y seroalbúmina disminuyó después de los siete días de maduración, lo cual evidencia un proceso proteolítico sobre tales proteínas.

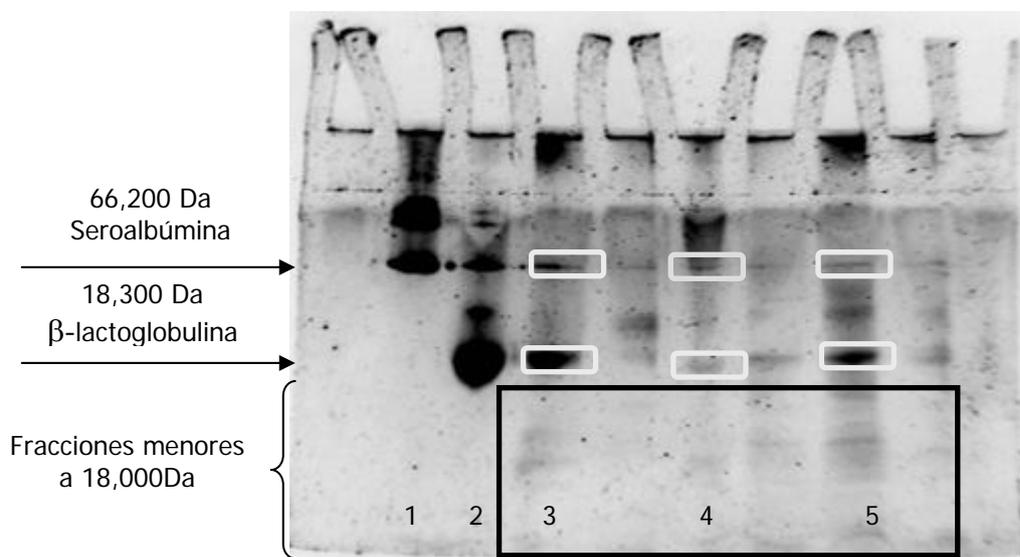
Las figuras 6, 7 y 8 muestran los patrones electroforéticos de las proteínas extraídas en las distintas muestras de queso a diferentes condiciones de maduración.



**Figura 6.** PAGE nativa T 12.5%. **Inicio de la maduración.** **1.** Seroalbúmina (1mg/mL); **2.**  $\beta$ -lactoglobulina (1mg/mL); **3.** Queso fresco de Michoacán; **4.** Queso maduro de Michoacán; **5.** Queso fresco de Hidalgo, y **6.** Queso maduro de Hidalgo.



**Figura 7.** PAGE nativa T 12.5 %. **Después de siete días de maduración a diferentes temperaturas (1).** **1.** Seroalbúmina (1mg/mL); **2.**  $\beta$ -lactoglobulina (1mg/mL); **3.** Queso fresco de Michoacán a 21°C; **4.** Queso fresco de Michoacán a 5°C, y **5.** Queso maduro de Michoacán a 21°C.



**Figura 8.** PAGE nativa T 12.5%. **Después de siete días de maduración a diferentes temperaturas (2).** **1.** Seroalbúmina (1mg/mL); **2.**  $\beta$ -lactoglobulina (1mg/mL); **3.** Queso maduro de Michoacán 5°C; **4.** Queso fresco de Hidalgo 5°C, y **5.** Queso maduro de Hidalgo 5°C.

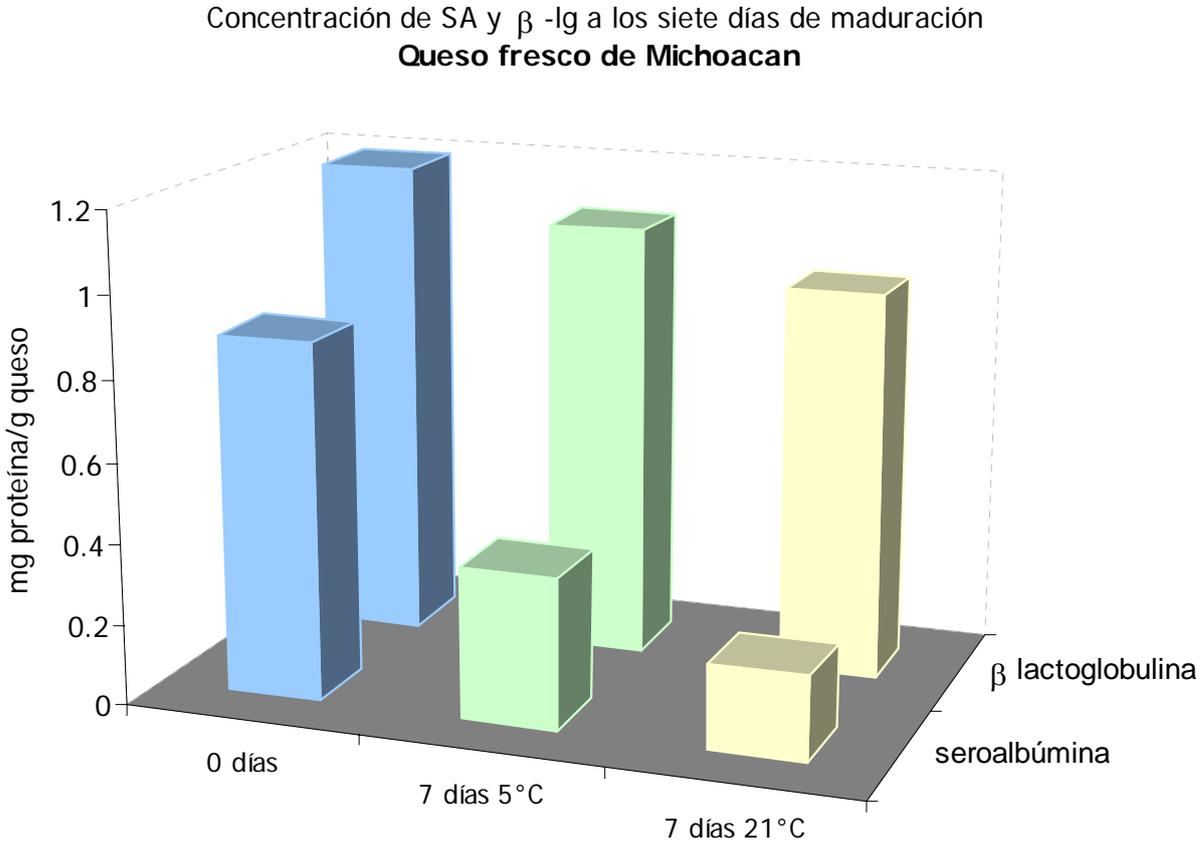
Mediante el software Molecular Analyst de Gel-Doc de Bio-Rad, se determinó la concentración de proteínas en los diferentes extractos, tomando como referencia soluciones de 1 mg/mL de  $\beta$ -lactoglobulina y de seroalbúmina. En la figura 7 y 8 (recuadro negro) se detectó la presencia de péptidos que no fueron identificados, ya que el tipo de gel y los patrones de PM no son los adecuados para este propósito. Para su identificación se utilizó una técnica de PAGE especial para péptidos. La tabla 7 muestra la concentración obtenida de las bandas representativas de SA y  $\beta$ -lg presentes en las muestras.

**Tabla 7.** Concentración de SA y  $\beta$ -lg después de siete días de maduración a 5 y 21°C.

Origen	Estado de maduración	Proteína	Temperatura °C	Inicio mg proteína extraída/g queso	Después de 7 días de maduración mg proteína extraída / g queso	Disminución %
Michoacán	Fresco	$\beta$ -Lactoglobulina	5	1.193	1.077	9.7
			21		0.961	19.5
		Seroalbúmina	5	0.882	0.376	57.4
			21		0.209	76.2
	Maduro	$\beta$ -Lactoglobulina	5	1.667	1.667	-
			21		1.463	12.3
Seroalbúmina	5	0.978	0.289	70.4		
	21		0.256	73.8		
Hidalgo	Fresco	$\beta$ -Lactoglobulina	5	1.039	0.367	64.6
		Seroalbúmina	5	0.636	0.056	91.2
	Maduro	$\beta$ -Lactoglobulina	5	1.0725	0.9837	8.1
		Seroalbúmina	5	0.4209	0.0969	76.9

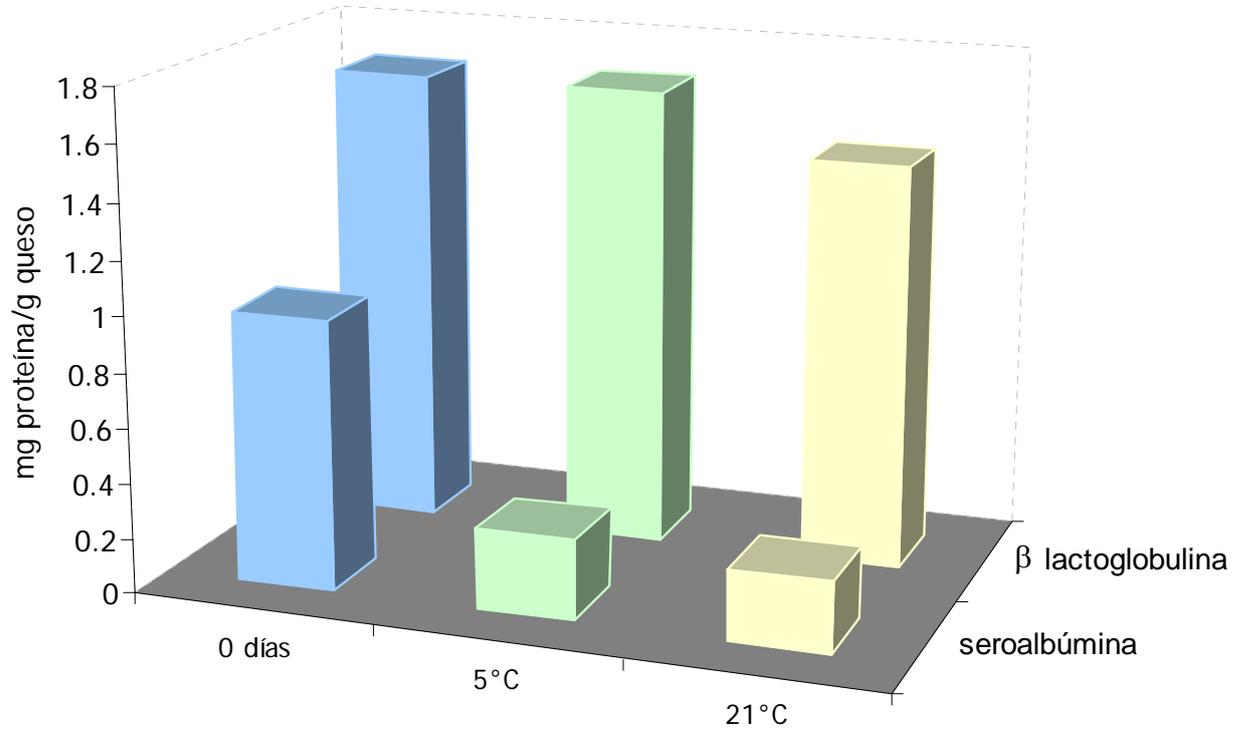
- = no hay disminución de proteína

Las figuras 9, 10, 11 y 12 muestran la concentración de proteínas del suero antes de almacenar los quesos, así como a los siete días de maduración.

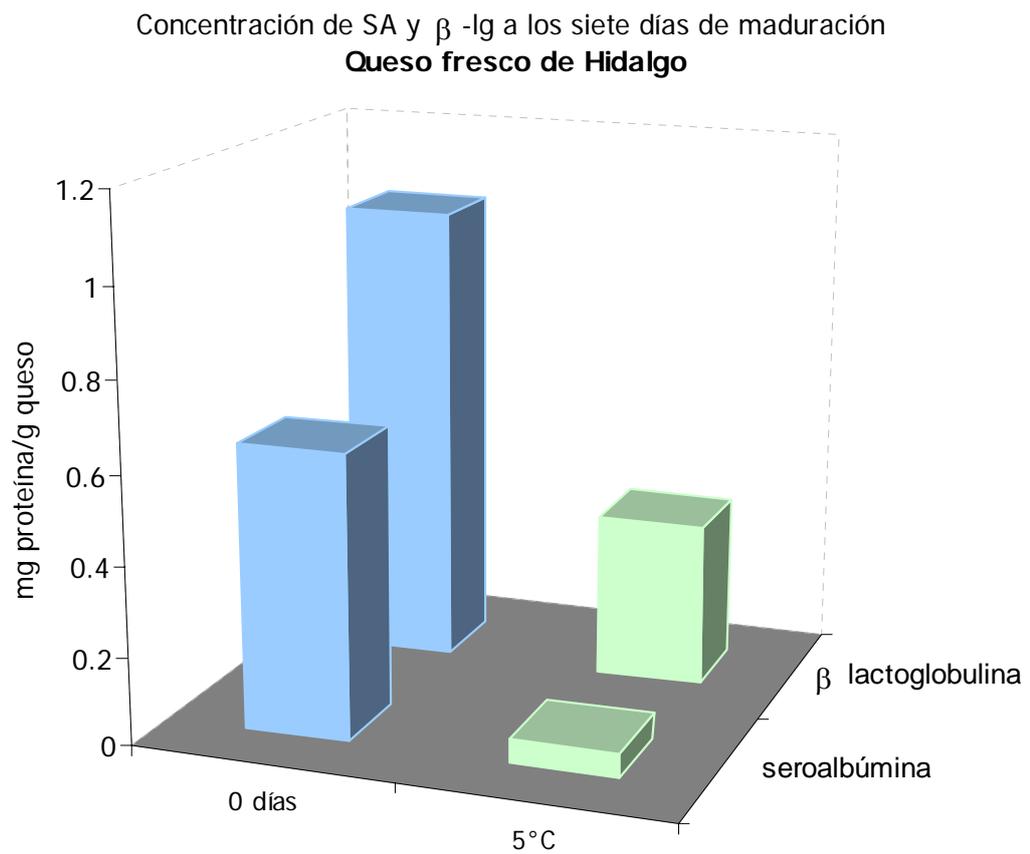


**Figura 9.** Concentración de proteínas del suero (SA y  $\beta$ lg) durante siete días de maduración en queso Cotija fresco procedente de Michoacán.

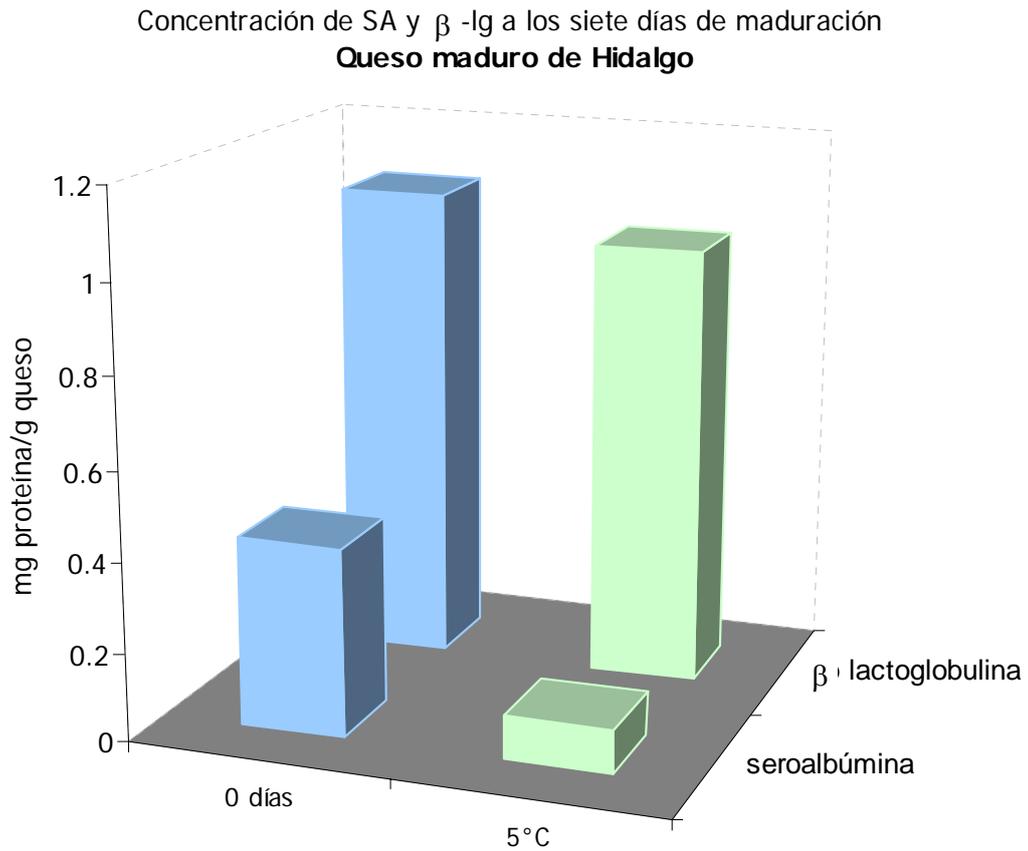
Concentración de SA y  $\beta$ -lg a los siete días de maduración  
**Queso maduro de Michoacán**



**Figura 10.** Concentración de proteínas del suero (SA y  $\beta$ lg) durante siete días de maduración en queso Cotija maduro procedente de Michoacán.



**Figura 11.** Concentración de proteínas del suero (SA y  $\beta$ lg) durante siete días de maduración en queso Cotija fresco procedente de Hidalgo.



**Figura 12.** Concentración de proteínas del suero (SA y  $\beta$ lg) durante siete días de maduración en queso Cotija maduro procedente de Hidalgo.

En todos los casos, la disminución de seroalbúmina es mayor que la de  $\beta$ -lactoglobulina. Lo anterior puede indicar una mayor afinidad por parte de las enzimas hacia la hidrólisis de la primera. También se observa que la cantidad de proteína hidrolizada es diferente en cada queso.

**Tabla 8.** Concentración de SA y  $\beta$ -lg después de siete días de maduración a 5°C.

<b>Origen</b>	<b>Estado de maduración</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Proteína</b>	<b>Disminución %</b>
Michoacán	Fresco	5	$\beta$ -Lactoglobulina	9.7
			Seroalbúmina	57.4
Hidalgo	Fresco	5	$\beta$ -Lactoglobulina	64.6
			Seroalbúmina	91.2
Michoacán	Maduro	5	$\beta$ -Lactoglobulina	-
			Seroalbúmina	70.4
Hidalgo	Maduro	5	$\beta$ -Lactoglobulina	8.1
			Seroalbúmina	76.9

Al comparar los quesos frescos almacenados a 5 °C (tabla 8), se observó, para ambas proteínas, mayor disminución en el queso de Hidalgo en comparación con el de Michoacán. En cuanto a los quesos maduros se observó que en el queso de Michoacán no hubo disminución en la concentración de  $\beta$ -lactoglobulina, mientras que en el procedente de Hidalgo hubo una disminución de 8.1 %. En cuanto a la seroalbúmina, la disminución en la cantidad de esta proteína fue similar en ambos casos.

Se trabajó con cuatro quesos diferentes adquiridos con distintos proveedores (Parte IV, 2); por lo tanto, la materia prima, el proceso de elaboración, el cuajo utilizado, los microorganismos presentes y las condiciones de maduración fueron distintos en cada caso. En este sentido, los resultados indican diferencias importantes en la capacidad proteolítica de los microorganismos presentes en cada uno de los quesos.

En el proceso proteolítico es importante considerar dos factores que son determinantes, de los cuales se había hecho mención anteriormente, éstos son la temperatura y la actividad acuosa.

En los quesos frescos se observó una disminución importante en la cantidad de SA y  $\beta$ -lg, lo que indica que la cantidad de agua disponible para que las reacciones enzimáticas hidrolíticas pudieran ocurrir era favorable.

Por otro lado, en los quesos maduros, la disminución de la concentración de  $\beta$ -lactoglobulina es muy pequeña (8.1 %), lo cual puede deberse al hecho de que -al ser quesos maduros- tienen una humedad baja y, por tanto, las reacciones enzimáticas están poco favorecidas, dando como resultado una proteólisis lenta.

En lo que se refiere a la temperatura de maduración, se observa que a 21 °C la disminución en la cantidad de proteína es mayor que a 5 °C, un hecho que indica que la proteólisis ocurre más rápidamente a 21°C, lo que a su vez quiere decir que los microorganismos y enzimas involucrados en el proceso tienen una temperatura óptima más cercana a 21 °C que a 5 °C.

En general, la cantidad de ambas proteínas disminuye conforme avanza la maduración. Esta disminución es consecuencia de la proteólisis que se lleva a cabo, y podría estar relacionada con el aumento de PS observado en los quesos (tabla 5 y 6). En la tabla 9 se presentan los resultados para los quesos frescos, en los cuales se detectó mayor proteólisis.

**Tabla 9.** Disminución de las proteínas del suero analizadas (SA y  $\beta$ -lg) y aumento de PS en quesos frescos de Michoacán e Hidalgo.

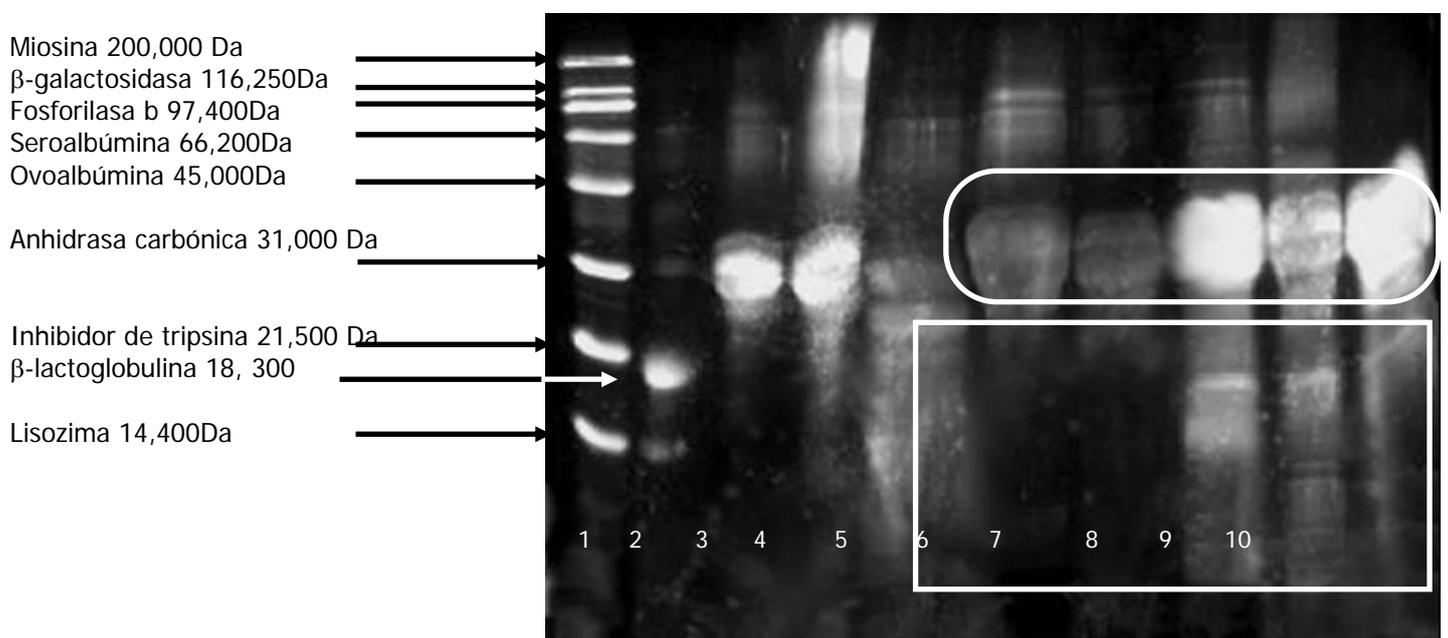
Temperatura °C	Queso fresco de Michoacán		Queso fresco de Hidalgo	
	Disminución de proteína (SA+ $\beta$ -lg) mg prot/ g queso	Aumento de PS (mg proteína/ g queso)	Disminución de proteína (SA+ $\beta$ -lg) mg prot/ g queso	Aumento de PS (mg proteína/ g queso)
5°	0.622 mg	3.683 mg	1.252 mg	2.504 mg
21°	0.905 mg	4.788 mg	--	

Al observar el aumento en la cantidad de PS y una disminución simultánea de las proteínas del suero  $\beta$ -lactoglobulina y seroalbúmina, se sugiere que una parte de la PS cuantificada pudo haberse generado a partir de la hidrólisis de dichas proteínas, sin embargo, hay una buena cantidad de péptidos cuyo origen no se puede explicar únicamente a partir de la hidrólisis de éstas, lo que sugiere que los péptidos formados podrían provenir de la descomposición de otras proteínas tales como las caseínas, que son las proteínas que se encuentran presentes en mayor concentración en el queso, pero que no fueron extraídas con los métodos empleados. La proteólisis de caseínas también da lugar a la formación de una gran cantidad de péptidos bioactivos conocidos,<sup>2</sup> razón por la cual es importante determinar su evolución en el queso que se está analizando.

En el método de extracción con buffer de fosfatos el pH se ajustaba a  $4.4 \pm 0.05$  con el fin de precipitar las caseínas intactas y las poco degradadas, encontrándose en solución las proteínas del suero, los péptidos de peso molecular

elevado y los de cadena corta,<sup>9</sup> lo que significa que dicho método sólo extraía PS, y las caseínas no pudieron ser cuantificadas.

Para lograr la separación de las caseínas provenientes del queso se aplicó un método de extracción con urea; con el fin verificar la eficacia de dicho método se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE cuyos resultados se muestran en la figura 13.



**Figura 13.** SDS-PAGE T 12.5%. **Verificación método de extracción de caseínas.** **1.** Estándar; **2.** β-lactoglobulina; **3.** Caseína MARCA HAMMARSTEN; **4.** Caseína MARCA MERCK; **5 a 10** quesos Cotija de diferente origen y tiempo de maduración.

La electroforesis PAGE permite el uso de estándares con los que es posible identificar el tipo y la cantidad de proteína presente en cada muestra analizada. En este caso se deseaba saber si el método de extracción utilizado era adecuado para identificar y calcular la concentración de caseínas presentes en el queso en diferentes etapas de maduración. La figura 13 muestra el gel electroforético obtenido; en él se

observan fracciones que, al ser comparadas con el estándar utilizado, se comprueba que son caseínas (recuadro superior). A partir de este paso se utilizó el método de extracción con urea, el cual, además de extraer caseínas, extrae también péptidos (recuadro inferior).

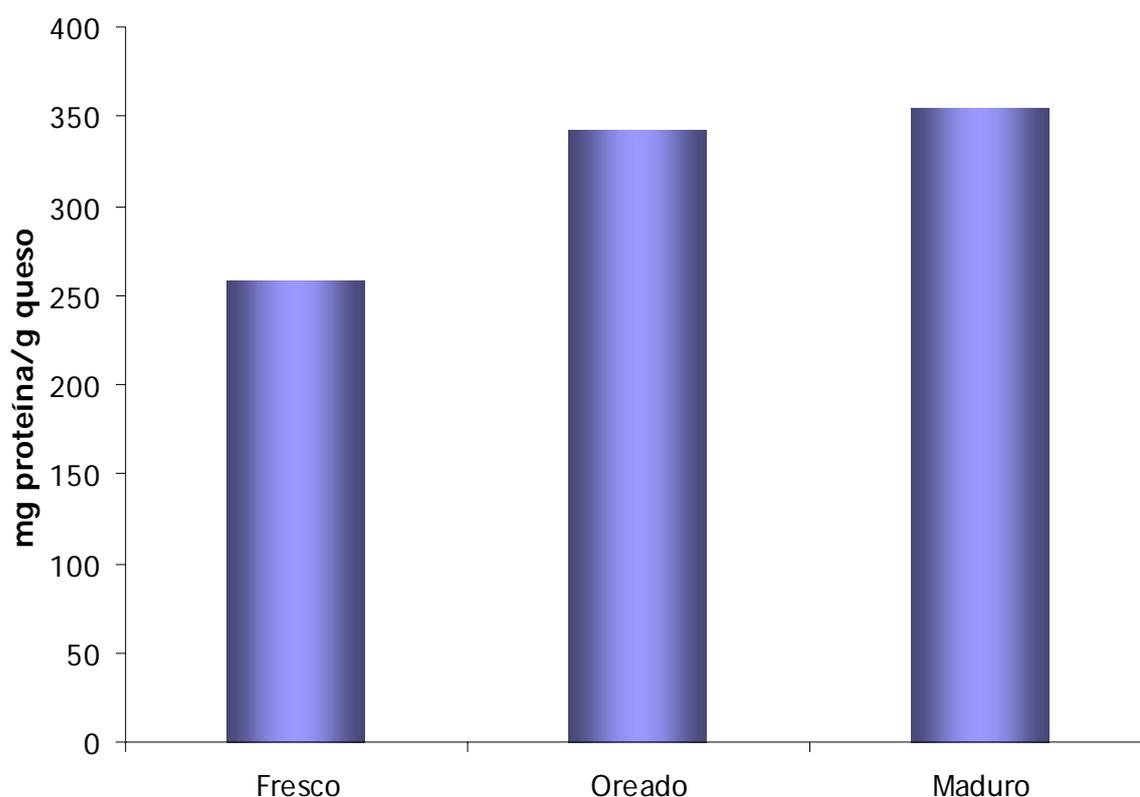
## 1.2 Análisis de las caseínas y de los péptidos a lo largo de la maduración del queso Cotija.

Para efectuar un análisis completo de los péptidos que son liberados a lo largo de la maduración del queso Cotija se requiere el seguimiento de la proteólisis desde que está recién elaborado hasta el momento en que se encuentra maduro. Dicho proceso requiere una amplia inversión de tiempo; por ello, para realizar el análisis de la proteólisis en las caseínas del queso y de los péptidos que son liberados como consecuencia de ésta, se adquirieron tres nuevas muestras de queso de un solo proveedor, con diferentes estados de maduración (fresco, oreado y maduro) en Los Reyes Michoacán. Aunque no se sabe el momento exacto de elaboración, ya que el productor no contaba con un registro de las fechas de elaboración, se conoce su estado de maduración aproximado. Las muestras fueron denominadas, de acuerdo con lo señalado por el productor, como “fresco” cuando el queso tenía menos de 10 días de haber sido elaborado; “oreado” cuando el queso tenía de 2 semanas a 1 mes de elaboración y “maduro” cuando el queso tenía más de 3 meses de elaboración.

Siendo las caseínas importantes precursoras de péptidos bioactivos, resulta importante analizar su evolución durante de la maduración del queso Cotija; para ello se determinó el contenido de proteína en los quesos con diferente grado de maduración, obteniendo los resultados presentados en la tabla 10.

**Tabla 10.** Concentración de proteína en queso Cotija con diferentes grados de madurez.

<b>Estado de maduración</b>	<b>Proteína extraída % (p/p)</b>
Fresco	25.848
Oreado	34.140
Maduro	35.515

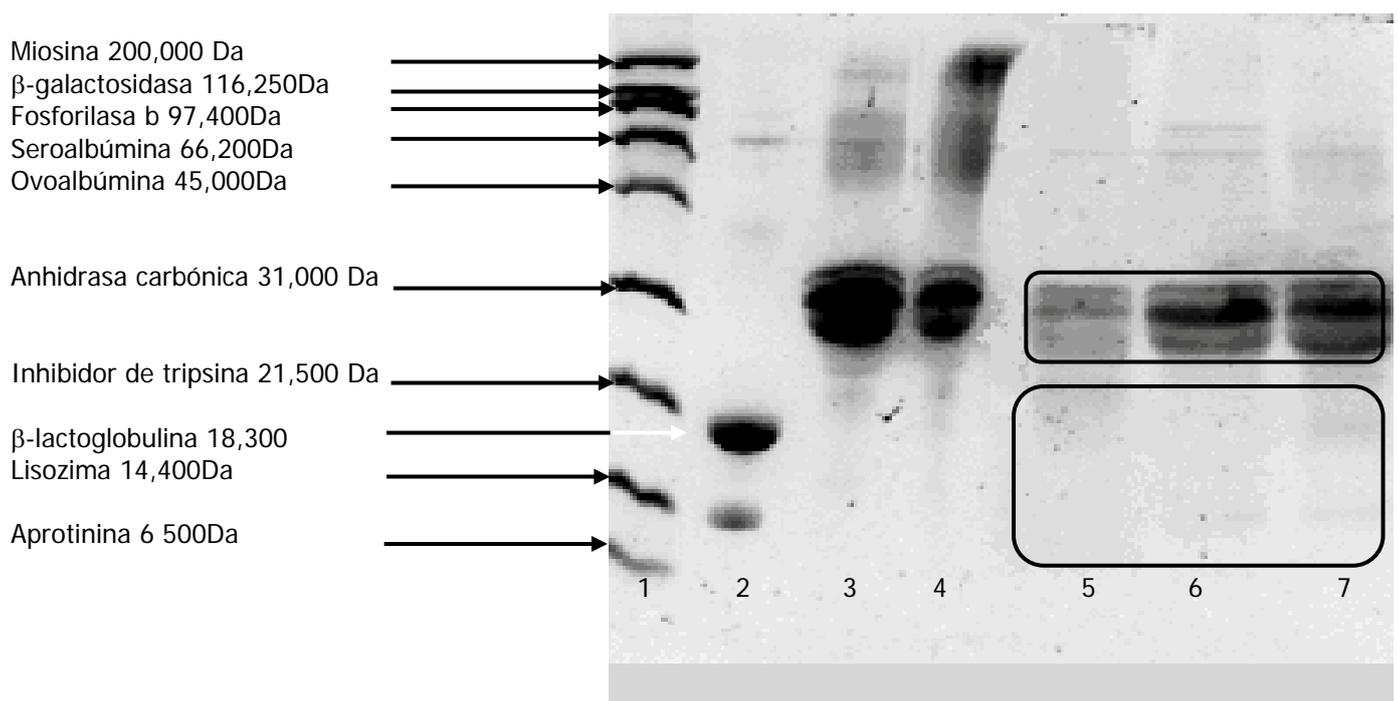


**Figura 14.** Concentración de proteína extraída en diferentes estados de maduración en queso Cotija determinado por el método de Lowry.

En la Figura 14 se observa que la concentración de caseína extraída aumenta conforme avanza la maduración del queso. Esto podría deberse a que, al verificarse un proceso proteolítico, la solubilidad de las caseínas aumenta, lo que facilita su

extracción; además de que los péptidos producidos por la hidrólisis son solubles y son determinados en estos extractos.

Se puede considerar que en la extracción realizada con urea se tiene en su mayoría caseínas debido a que éstas representan aproximadamente el 99 % del total de proteínas en el queso;<sup>20</sup> sin embargo, con la finalidad de corroborar que el aumento en la concentración de proteínas se debió al incremento en su solubilidad, lo que dio como resultado una mayor cantidad de proteína extraída, se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE, obteniendo el gel electroforético presentado en la figura 15.



**Figura 15.** Electroforesis SDS-PAGE T 12.5%. **1.** Estándar PM; **2.** β-lactoglobulina (1mg/mL); **3.** caseína marca HAMMARSTEN; **4.** caseína marca MERCK; **5.** Queso Cotija fresco; **6.** Queso Cotija oreado; **7.** Queso Cotija maduro.

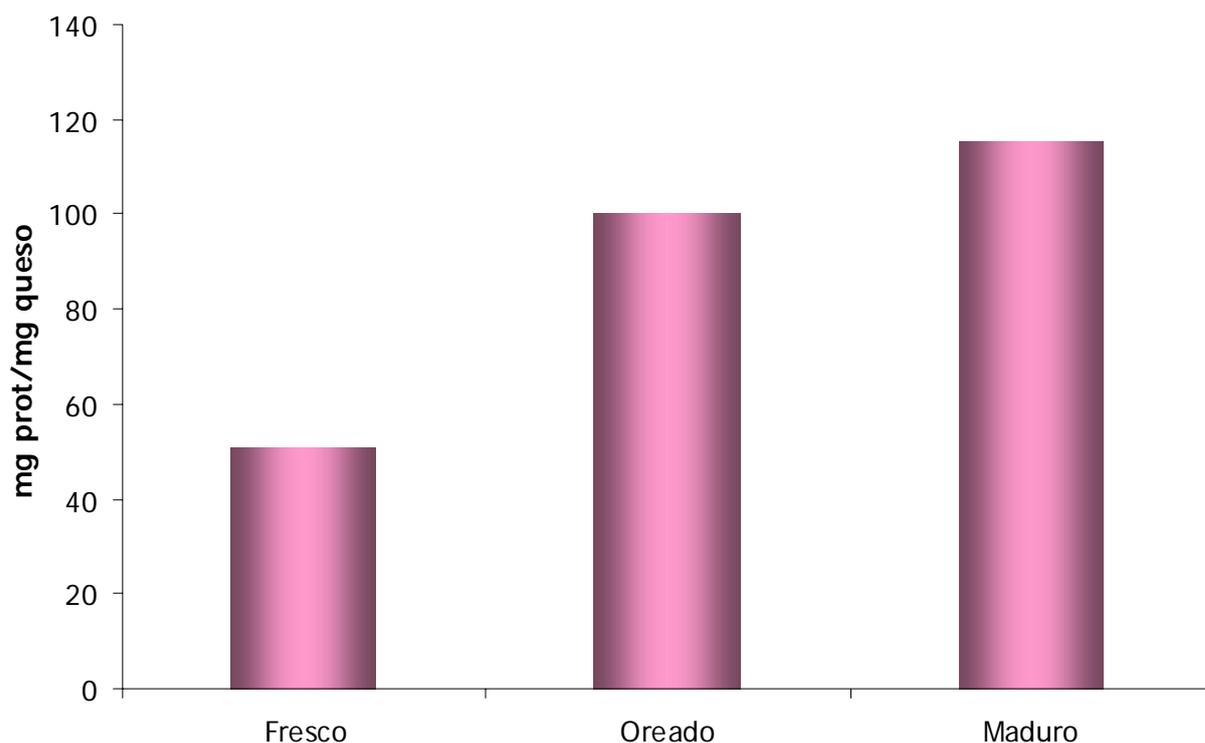
Para la evaluación de la proteólisis que ocurre en las caseínas se consideró a todas las fracciones de caseína como cantidad de caseína total. En el recuadro superior de figura 15 se resaltan las fracciones de caseína.

Resulta evidente que la cantidad de estas proteínas aumenta conforme lo hace el grado de maduración. Se observan, así mismo, bandas atenuadas en el queso fresco (carril 5), mientras que en el queso maduro (carril 7) se observan bandas con una intensidad mayor; confirmándose lo obtenido anteriormente mediante el método de Lowry. Además, se observan mayor bandas de bajo peso molecular (recuadro inferior), que podrían ser péptidos, mismas que aumentan conforme avanza la maduración (recuadro inferior).

Mediante densitometría con PAGE es posible cuantificar las fracciones de proteína deseadas. Este método permite identificar cambios en la concentración de proteínas específicas (en este caso de caseínas) a lo largo de la maduración del queso. La tabla 11 y la figura 16 muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 11.** Concentración de caseínas extraídas.

Muestra	Proteína extraída % (p/p)
Queso Cotija fresco	5.086
Queso Cotija oreado	10.007
Queso Cotija maduro	11.547



**Figura 16.** Concentración de caseínas presente en queso Cotija en diferentes estados de maduración obtenida mediante electroforesis SDS-PAGE.

En la figura 16 se observa que la concentración de caseína aumenta desde el queso fresco hasta el queso maduro. Mediante este resultado se puede sustentar que la proteólisis en las caseínas originó un aumento en su solubilidad, lo que provocó un incremento en la cantidad de proteína extraída, registrando un aumento en la concentración de proteína, tanto por el método de Lowry como por electroforesis.

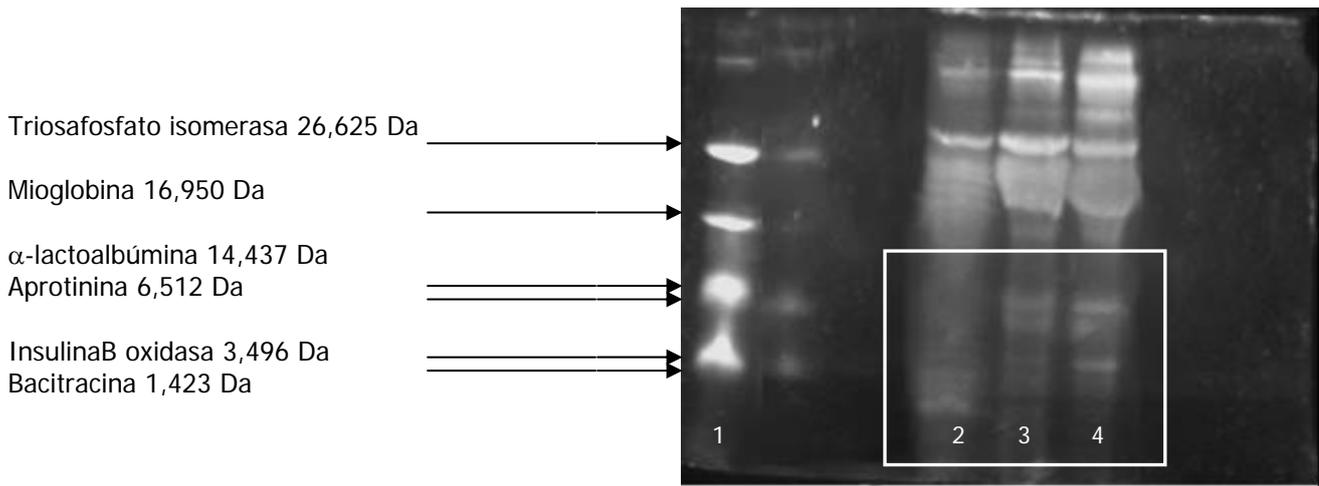
De acuerdo con los resultados obtenidos se ha evidenciado la existencia de un proceso proteolítico durante el cual las proteínas presentes en el queso son degradadas a péptidos, siendo de especial interés en este caso los péptidos de bajo peso molecular, ya que en algunos de ellos se ha informado algún tipo de actividad biológica.

La proteólisis es uno de los eventos más importantes durante la maduración del queso: influye en la textura y sabor así como en la producción de péptidos que presentan actividad biológica.

Durante la maduración, los principales componentes del queso son degradados a productos primarios, y posteriormente a productos secundarios; en el caso de las proteínas, éstas son hidrolizadas a péptidos de peso molecular elevado, péptidos pequeños, aminoácidos y aminos -en ese orden- a lo largo del tiempo.<sup>11</sup>

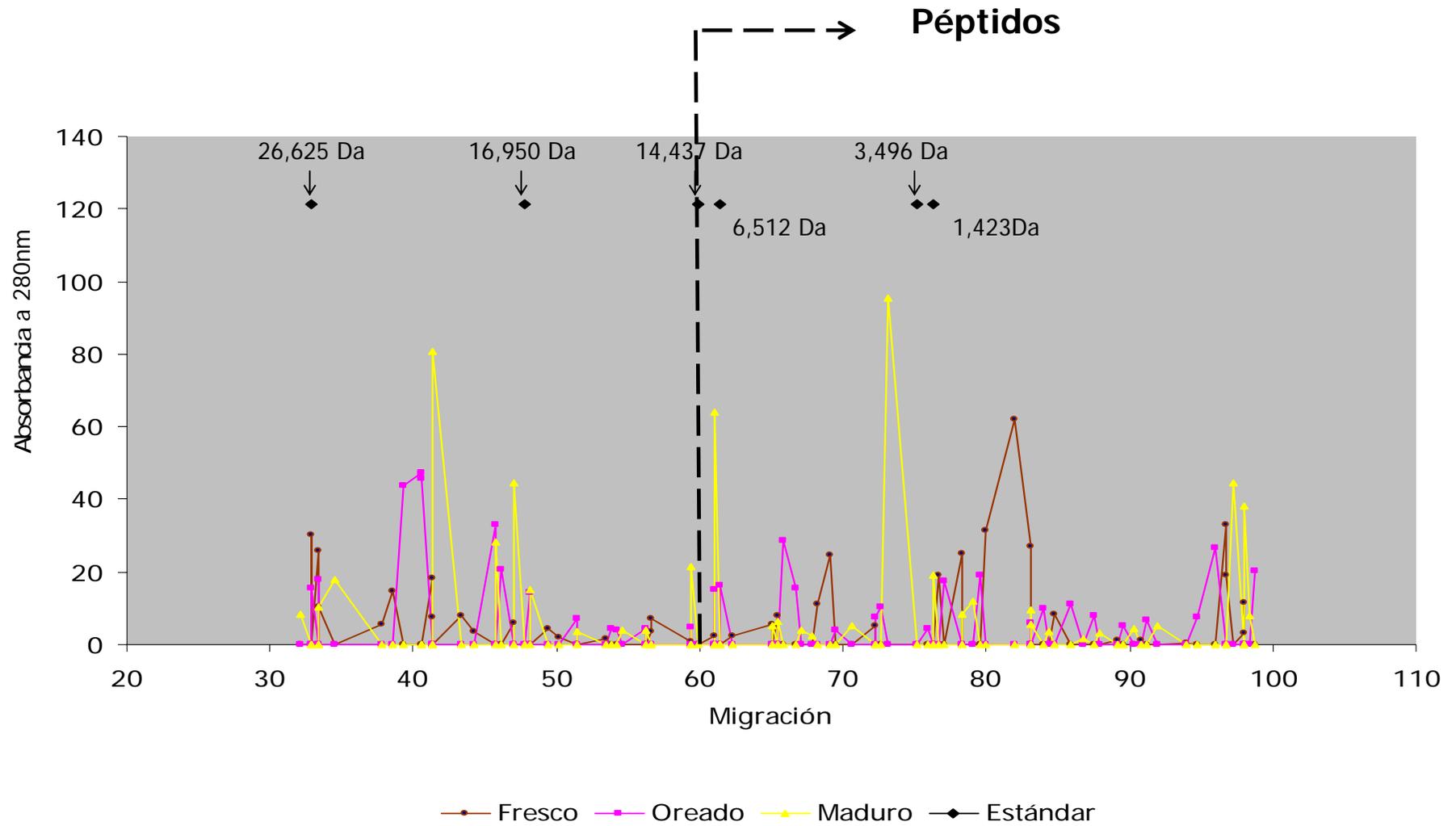
Con la finalidad de identificar y cuantificar los péptidos presentes en los diferentes tiempos de maduración del queso Cotija, se realizó una electroforesis Tricina-SDS-PAGE, la cual permite identificar proteínas en el rango de 1 000 a 10 000 Da.<sup>31</sup>

En la figura 17 se muestra el patrón electroforético de los péptidos extraídos en los quesos en los diferentes estados de maduración. Se detecta una gran variedad y cantidad de péptidos (recuadro).



**Figura 17.** Electroforesis para péptidos Tris-SDS PAGE T 20%. **1.** Estándar (polypeptide SDS-PAGE standard); **2.** Queso fresco; **3.** Queso oreado, y **4.** Queso maduro.

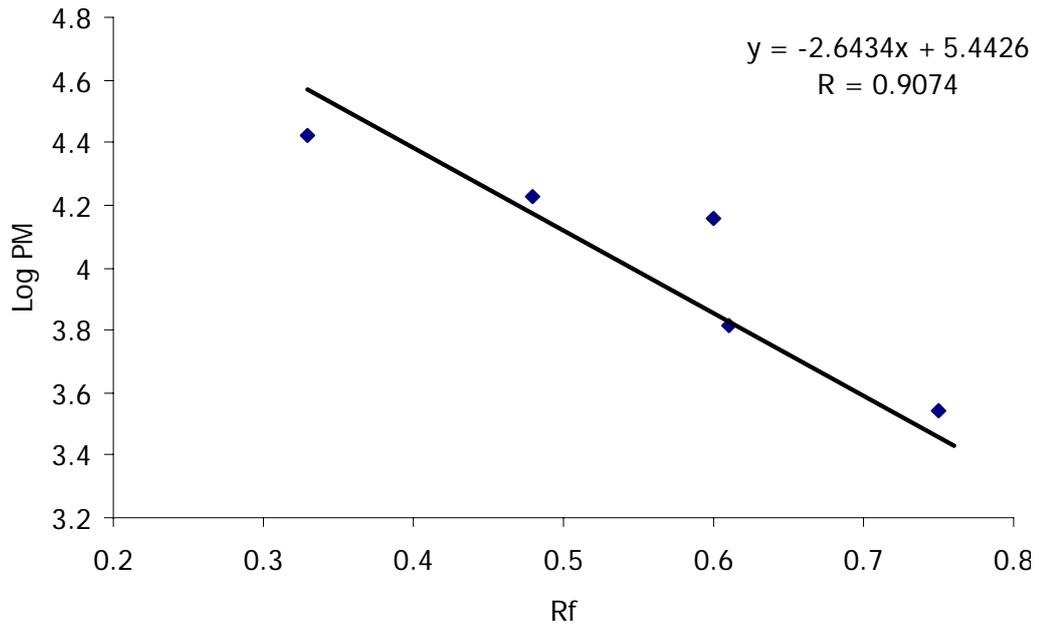
Para identificar los péptidos presentes en cada etapa de maduración del queso se llevó a cabo el análisis del gel obtenido mediante el software Molecular Analyst de Gel-Doc de Bio-Rad. Para dicha identificación se tomó como patrón una solución estándar de proteínas cuyo peso oscilaba entre 1 423 y 26 625 Da (polypeptide SDS-PAGE standard). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 18.



**Figura 18.** Perfil de péptidos y proteínas entre 26,625 y 1 423 Da identificados en queso Cotija con diferente estado de maduración.

En esta gráfica cada pico o punto representa un péptido. En el eje "X" se representa la migración en el gel de electroforesis tanto de las bandas representativas del estándar (parte superior de la gráfica, señalando el PM en cada caso), así como de cada una de las bandas (péptidos) presentes en los diferentes estados de maduración. La migración del estándar nos permite identificar, por comparación, el PM de los péptidos presentes en cada estado de maduración del queso Cotija; por lo tanto se dice que la migración (factor de retención) ( $R_f$ ) se encuentra relacionada con el peso molecular. En el eje "Y" se representa la absorbancia de cada una de las bandas presentes en el gel en donde el área debajo de cada pico es proporcional a la concentración del péptido que representa. Podemos observar una gran variabilidad de péptidos en cada estado de maduración, siendo de interés los péptidos de bajo peso molecular.

La figura 19 muestra la curva estándar mediante la cual se determinó el peso molecular de los péptidos encontrados en las diferentes etapas de maduración del queso.



**Figura 19.** Curva estándar para la determinación del peso molecular de los péptidos.

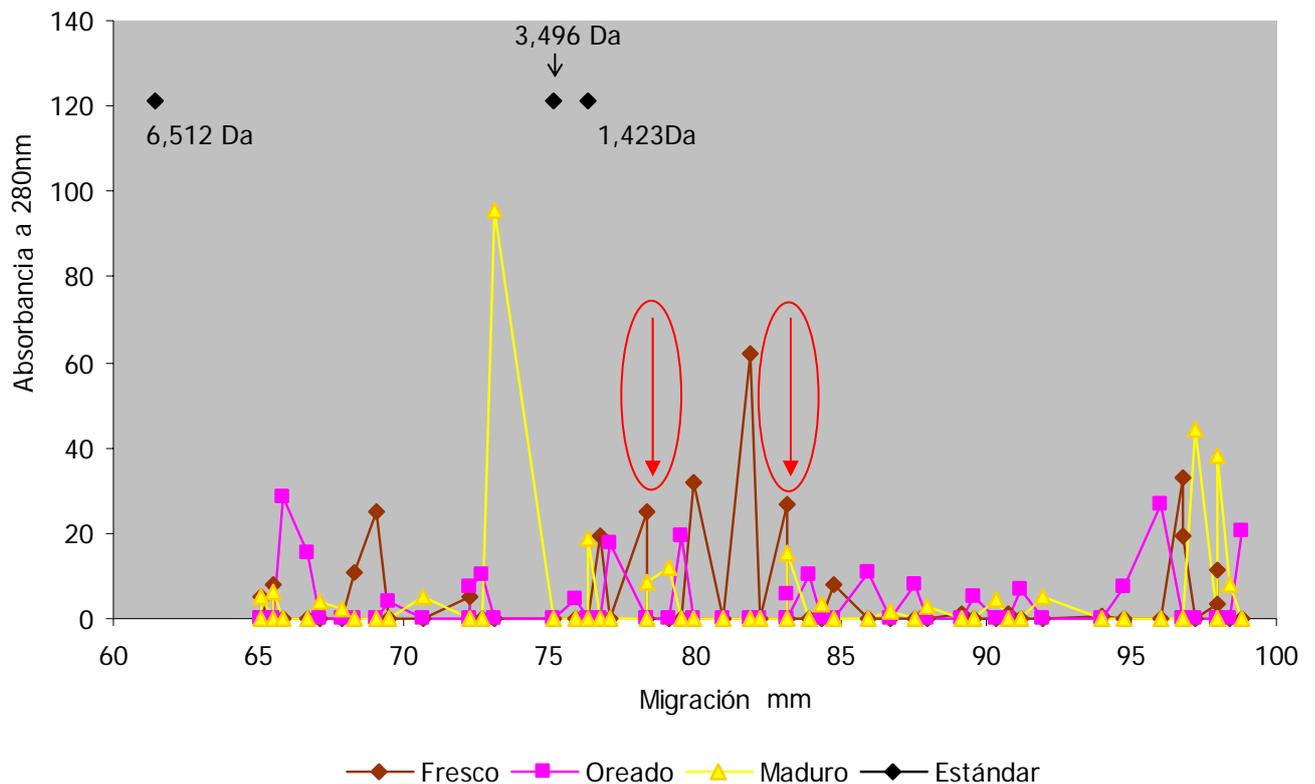
Esta curva fue generada a partir del estándar utilizado en la electroforesis Tris-SDS-PAGE calculando el Rf de las bandas correspondientes a cada una de las proteínas en dicho estándar. Posteriormente, a partir de la ecuación  $\text{Log PM} = (-2.6434 * \text{Rf}) + 5.4426$ , se calculó el peso molecular de los péptidos presentes en cada etapa de maduración.

En la tabla 12 se muestran los péptidos identificados cuyo peso oscilaba entre 416 y 4916 Da. En queso fresco se identificaron diecisiete péptidos, en queso oreado se encontraron dieciocho, y en cuanto al queso maduro se encontraron diecisiete péptidos diferentes en el rango de peso mencionado anteriormente.

**Tabla 12.** Péptidos detectados en diferentes etapas de maduración en queso Cotija.

<b>Péptido PM (Da)</b>	<b>FRESCO</b>	<b>OREADO</b>	<b>MADURO</b>
4916	√		√
4773	√		√
4635		√	
4370		√	
4243			√
4001		√	
3885	√		
3663	√		
3557		√	
3257			√
2895	√	√	
2811		√	
2730			√
2222		√	
2158			√
2095	√		
2034		√	
1863	√		√
1756			√
1705		√	
1656	√		
1429	√		
1309	√	√	√
1234		√	
1198			√
1164	√		
1065		√	
1004			√
947		√	
920			√
842	√		
818		√	
771			√
749	√		
727		√	
685			√
592	√		
558		√	
511		√	
482	√		
482	√		
468			√
441	√		√
428			√
416		√	

Tomando en cuenta los péptidos menores a 4916 Da, en los tres estados de maduración se observa coincidencia de un péptido cuya migración fue de 83 mm con un peso de 1309 Da (Figura 20). De igual forma, en los quesos fresco y maduro se observan coincidencias en el caso del péptido cuya migración fue de 78 mm con un peso de 1863 Da. Ambos péptidos están señalados con una flecha en la figura 20. Otras coincidencias fueron observadas pero únicamente los péptidos mencionados coinciden en tamaño con los que se informan como bioactivos en la bibliografía.



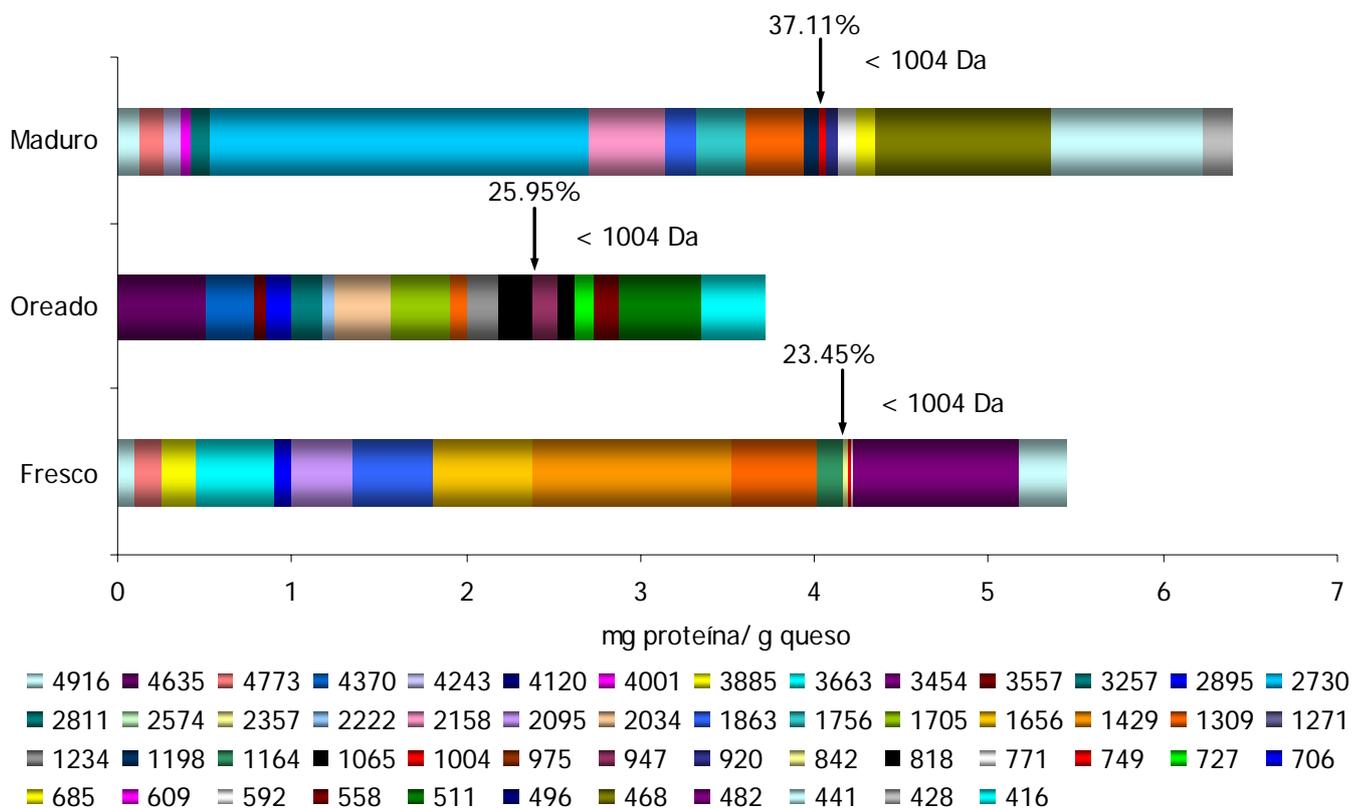
**Figura 20.** Perfil de péptidos entre 4916 y 400 Da identificados en queso Cotija con diferente estado de maduración.

En ningún caso se observa la disminución en la concentración de algún péptido conforme avanza la maduración, sino que en cada estado de maduración se

registra la presencia de péptidos diferentes, los cuales pudieron haber sido generados a partir de proteínas o de péptidos que, por acción de enzimas específicas, dan origen a péptidos más pequeños. De lo anterior se puede sugerir la presencia de péptidos específicos en cada estado de maduración.

El tipo de péptidos y la cantidad total de éstos varía en cada etapa de maduración. Mediante el análisis del gel se obtuvo la concentración de los péptidos presentes en cada etapa de maduración. La figura 21 muestra la concentración de cada uno de los péptidos identificados; en ella se observa que la concentración total de péptidos en el queso fresco es mayor que en el queso oreado. En ese contexto, se esperaría que conforme avanza el tiempo de maduración la cantidad de péptidos fuese aumentando debido a la proteólisis que se está llevando a cabo; sin embargo, la concentración de péptidos es mayor en el queso fresco que en el oreado, lo que podría deberse a que en el queso oreado se llevó a cabo un proceso de desuerado durante algunos días, provocando la pérdida de péptidos, traduciéndose lo anterior en una disminución en la cantidad de éstos entre el estado fresco y el oreado. En el tiempo de maduración que transcurre entre el queso oreado y el maduro la cantidad de péptidos aumenta debido al proceso proteolítico que ocurrió en este periodo.

Al considerar únicamente los péptidos más pequeños (< 1004 Da) se observó que su cantidad aumentó conforme avanzaba el grado de madurez. Así, se observa en la figura 21 un 23.45 % de péptidos menores a 1004 Da en el queso fresco, un 25.95 % en el oreado, y un 37.11 % en el maduro.



**Figura 21.** Concentración de péptidos entre 416-4916 Da presentes en queso Cotija con diferente estado de maduración.

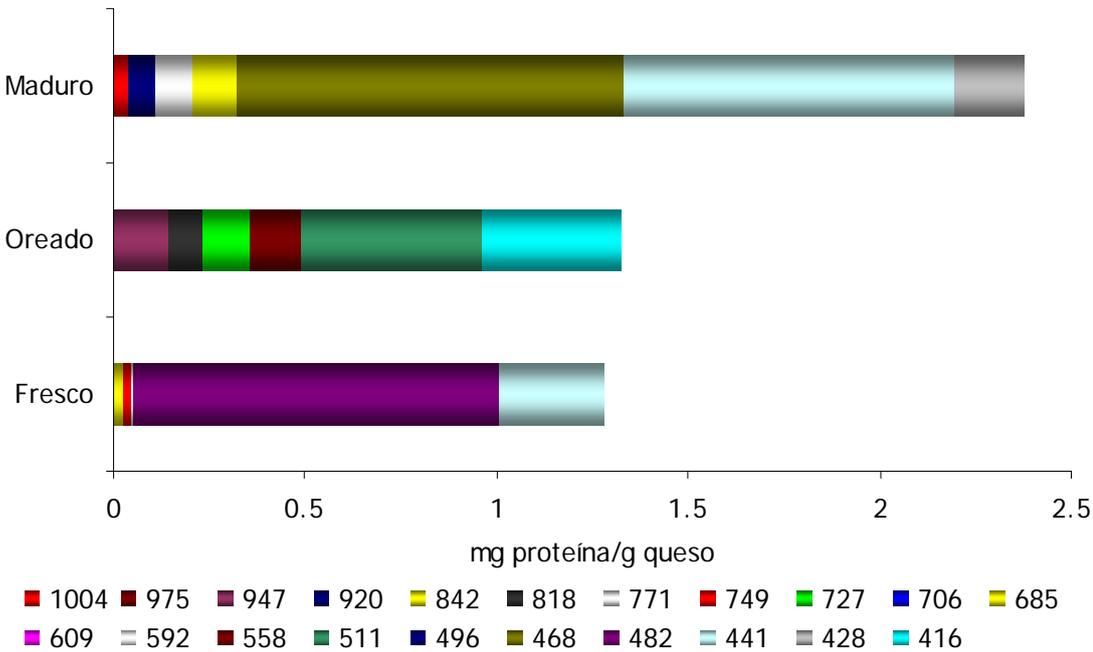
La proteólisis en el queso puede ser dividida en tres fases: la que se lleva a cabo en la leche antes de fabricar el queso; la enzimática, que induce la coagulación de la leche, y la proteólisis durante la maduración del queso.<sup>10</sup>

En la fase de coagulación se tienen dos etapas. En la primera, la  $\kappa$ -caseína es hidrolizada, y en la segunda se generan péptidos; por ello, en el queso fresco observamos pocos péptidos menores a 1004 Da, pues no hubo suficiente tiempo para un mayor avance de la proteólisis.

Durante la maduración, las proteínas son degradadas a productos primarios; ocurre lo que se conoce como proteólisis primaria, en la que se liberan

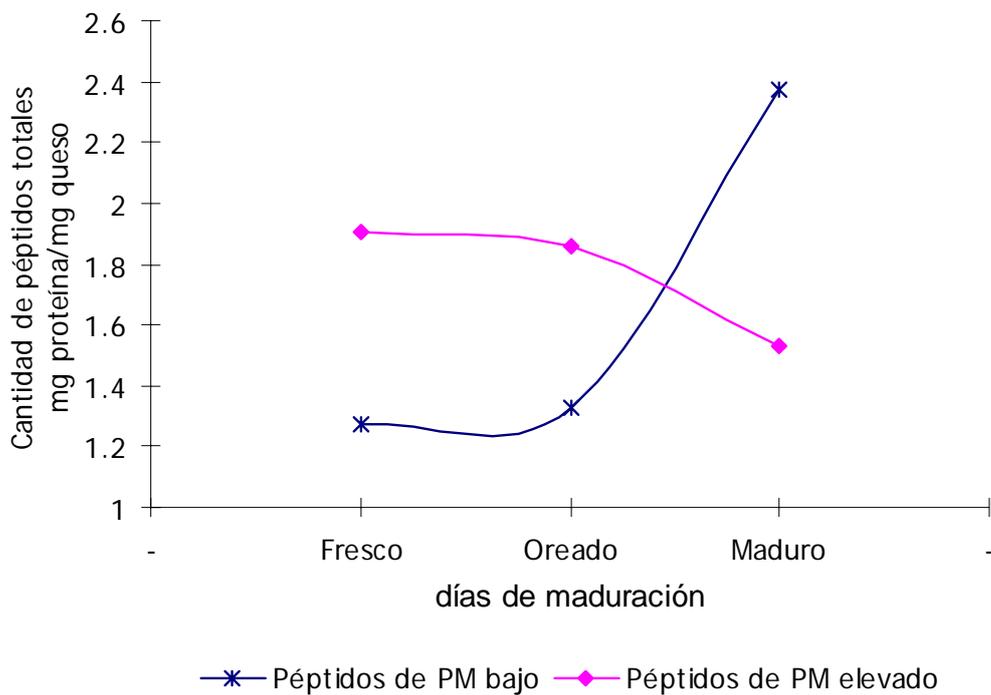
principalmente péptidos de peso molecular elevado, y posteriormente, conforme avanza la maduración, se observa la disminución de la concentración de éstos, dando lugar a productos secundarios (péptidos de menor peso molecular). La degradación de las proteínas se da en el siguiente orden: péptidos de peso molecular elevado- péptidos de bajo peso molecular- aminoácidos.<sup>11</sup>

Así, en la figura 22 podemos observar un menor porcentaje (del total de los péptidos analizados) de péptidos menores a 1004 Da en el queso fresco, cuya concentración aumenta al mismo tiempo que avanza el tiempo de maduración. En este caso resultan de especial interés los péptidos de peso molecular bajo, ya que la mayoría de los péptidos informados en la bibliografía como bioactivos son péptidos de bajo peso molecular.



**Figura 22.** Péptidos menores a 1004 Da presentes en queso Cotija con diferente estado de maduración.

Lo anterior sugiere que la proteólisis está ocurriendo en el orden informado, produciéndose primero péptidos de alto peso molecular, para finalmente tener la presencia de péptidos de peso molecular bajo, es decir, conforme avanza el tiempo de maduración algunos de los péptidos de peso molecular bajo pudieron haber sido producidos a partir de la hidrólisis de los péptidos de alto peso molecular; dicho comportamiento puede observarse en la figura 23:



**Figura 23.** Evolución de péptidos entre 416-1004Da (PM bajo) y 3257-4916 Da (PM elevado) durante la maduración de queso Cotija.

Diversos autores han determinado la funcionalidad de péptidos por comparación con péptidos informados en la bibliografía. Entre dichos autores se encuentran Fiat y colaboradores,<sup>35</sup> quienes, en 1989, por medio de digestión de  $\kappa$ -caseína con quimosina, obtuvieron dos péptidos antitrombóticos cuya funcionalidad fue determinada por comparación con péptidos sintéticos previamente informados.

En el presente estudio se realizó una investigación bibliográfica de los péptidos informados como bioactivos que son liberados como consecuencia de la proteólisis en la leche y en productos lácteos por las bacterias lácticas. Dichos péptidos fueron comparados con los que se encontraron en cada una de las etapas de maduración del queso Cotija. La comparación se hizo con base en los pesos moleculares. Los resultados obtenidos se informan a continuación:

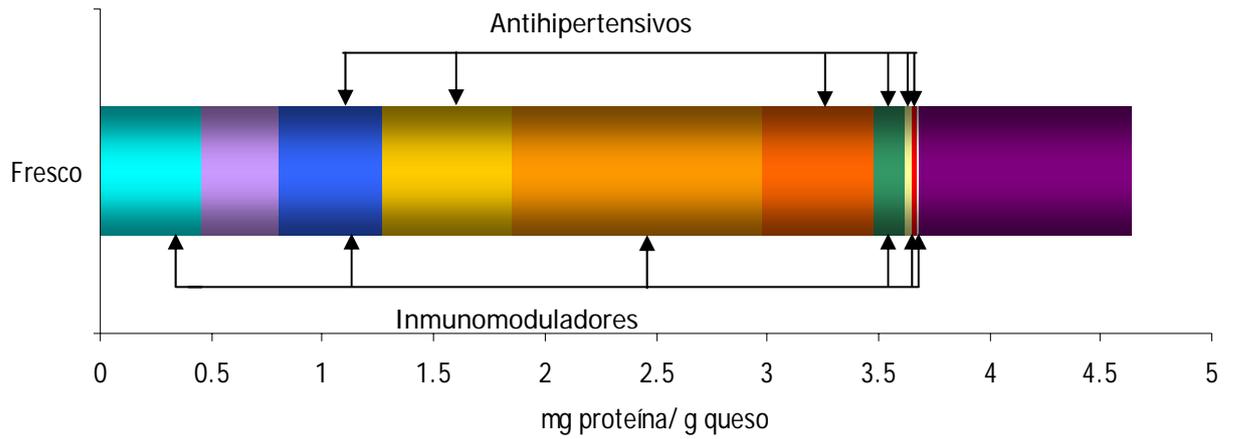
### **Queso fresco**

En el queso fresco se encontraron diecisiete péptidos diferentes, menores a 4916 Da (tabla 12). El peso molecular de once de ellos coincide con el de péptidos que han sido informados como bioactivos. El peso, bioactividad y proteína precursora de dichos péptidos se muestra en la tabla 13.

El péptido que se encuentra en mayor concentración es aquel cuyo peso es de 1417.6 Da que, de acuerdo con lo informado en la bibliografía, podría tratarse de un caseinofosfopéptido proveniente de la  $\alpha_{s2}$ -caseína, el cual presenta actividad de inmunomodulador y acarreador de minerales. En orden decreciente de concentración, se encuentra el péptido cuyo peso molecular es 489.6 Da, el cual coincide con el péptido de 482 Da de peso que presenta actividad antitrombótica y cuya proteína precursora es la lactoferrina. Aunque en menor concentración, en este estado de maduración también se encuentran péptidos con actividad antimicrobiana (2101.6 Da y 1881.3 Da).

En la figura 24 se observa que en este estado de maduración la mayoría de los péptidos identificados presentan actividad inmunomoduladora y antihipertensiva, hallándose en mayor concentración los péptidos con actividad inmunomoduladora.

### Péptidos identificados en queso Cotija fresco



■ 3669.3 ■ 2101.6 ■ 1881.3 ■ 1655.9 ■ 1417.6 ■ 1292.5 ■ 1156.3 ■ 837.2 ■ 747.8 ■ 593.7 ■ 489.6

**Figura 24.** Concentración de péptidos entre 416- 4916 Da identificados en queso Cotija fresco.

**Tabla 13.** Comparación de péptidos identificados en queso Cotija fresco con los informados en la bibliografía.

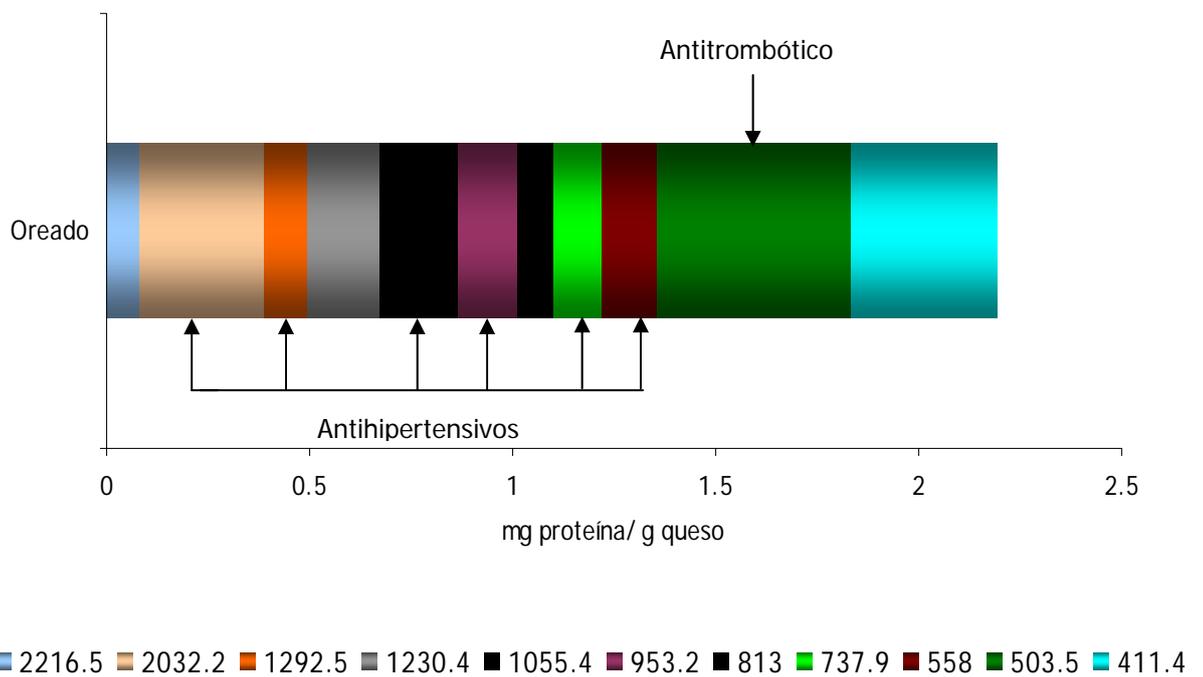
Péptido	PM Informado	PM Determinado	Actividad	Proteína precursora	Fragmento	Fuente
	482	489.6	Antitrombótico	Lactoferrina		22
	592	593.7	Inmunomodulador	$\beta$ - CN	63-68	18
$\beta$ -casoquinina	749	747.8	Antihipertensivo (Inhibidor de la ACE), Inmunomodulador	$\beta$ - CN	193-198	18, 26
	842	837.2	Antihipertensivo (Inhibidor de la ACE)	$\alpha$ -Lactoglobulina	142-148	22
$\beta$ -casoquinina-10	1164	1156.3	Antihipertensivo (Inhibidor de la ACE), Inmunomodulador	$\beta$ - CN	193-202	18,23,36,37,38,39
$\alpha_{S1}$ -casoquinina-7	1309	1292.5	Antihipertensivo (Inhibidor de la ACE)	$\alpha_{S1}$ - CN	28-38	39
Caseinofosfopéptido	1429	1417.6	Acarreador de minerales, Inmunomodulador	$\alpha_{S2}$ - CN	6-18	39
	1656	1655.9	Antihipertensivo (Inhibidor de la ACE)	$\beta$ - CN		20,36,39
	1863	1881.3	Antimicrobiano, Inmunomodulador, Antihipertensivo (Inhibidor de la ACE)	$\beta$ - CN	193-209	18,37,39
	2095	2101.6	Antimicrobiano	$\beta$ - CN	164-179	18,20
Caseinofosfopéptido	3663	3669.3	Inmunomodulador	$\alpha_{S2}$ - CN	1-32	18

## **Queso oreado**

En el queso oreado se encontraron dieciocho péptidos diferentes, menores a 4916 Da (tabla 12), de los cuales once de ellos fueron identificados. La tabla 14 muestra la funcionalidad y las proteínas precursoras de los péptidos encontrados. En la figura 25 se puede observar que el péptido que se encuentra en mayor concentración es el de peso igual a 503.5 Da, el cual podría ser un péptido proveniente de la  $\kappa$ -caseína que presenta actividad antitrombótica. Siguiendo en orden decreciente de concentración, se encuentra un péptido cuyo peso molecular es de 411.4 Da, el cual podría corresponder al péptido de peso 416 Da que presenta actividad opioide antagonista. En menor concentración se encuentran péptidos acarreadores de minerales (2216.5 Da, 1230.4) así como con actividad inmunomoduladora (1230.4 Da).

Se observa que los péptidos identificados en su mayoría presentan actividad antihipertensiva; éstos en conjunto representan la mayor cantidad de péptidos presentes en este estado de maduración. Dichos péptidos, de acuerdo con lo informado, provienen de la  $\alpha_{S1}$ -caseína,  $\alpha_{S2}$ -caseína y de la  $\beta$ -caseína.

### Péptidos identificados en queso Cotija oreado



**Figura 25.** Concentración de péptidos entre 416- 4916 Da identificados en queso Cotija oreado.

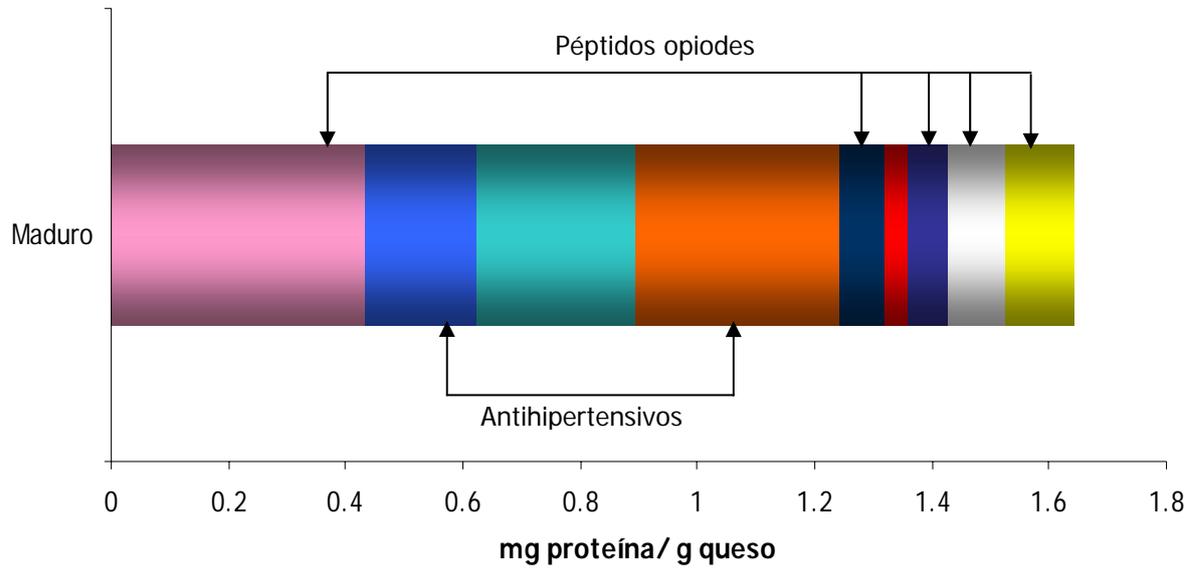
**Tabla 14.** Comparación de péptidos identificados en queso Cotija oreado con los informados en la bibliografía.

Péptido	PM Informado	PM Determinado	Actividad	Proteína precursora	Fragmento	Fuente
	416	411.4	Antagonista opioide	$\kappa$ - CN	61-63	31
	511	503.5	Antitrombótico	$\kappa$ - CN	113-116	18
	558	556.7	Antihipertensivo (Inhibidor de la ACE)	$\alpha_{s2}$ - CN	198-202	18
	727	737.9	Antihipertensivo (Inhibidor de la ACE)	$\alpha_{s2}$ - CN	174-179	18
	818	813	Antagonista Opioide	$\kappa$ - CN	35-41	18
	947	953.2	Antihipertensivo (Inhibidor de la ACE)	$\beta$ - CN		22
	1065	1055.4	Antihipertensivo (Inhibidor de la ACE)	$\alpha_{s1}$ - CN	1-9	29
Caseinofosfopéptido	1234	1230.4	Acarreador de minerales Inmunomodulador	$\beta$ - CN	7-18	29
$\alpha_{s1}$ -casoquinina-7	1309	1292.5	Antihipertensivo Inhibidor de la ACE)	$\alpha_{s1}$ - CN	28-38	39
	2034	2032.2	Antihipertensivo (Inhibidor de la ACE)	$\beta$ - CN		39
Caseinofosfopéptido	2222	2216.5	Acarreador de minerales	$\alpha_{s1}$ - CN	1-20	20

## Queso maduro

En el queso maduro se encontraron diecisiete péptidos diferentes, menores a 4916 Da, mencionados en la tabla 12, de los cuales nueve de ellos fueron identificados (Tabla 15). El péptido que se encuentra en mayor concentración es el péptido cuyo peso es de 2173.7 Da, el cual se ha agrupado en la figura 26 como un péptido opioide, aunque en realidad podría tratarse de un péptido informado en la bibliografía como precursor de la  $\beta$ -camorfina -un péptido opioide- con un peso de 2158 Da. Se observa que los péptidos identificados, en su mayoría, presentan actividad opioide, proviniendo de la  $\beta$ -caseína y la  $\kappa$ -caseína. Asimismo, se observan principalmente péptidos antihipertensivos (inhibidores de la ACE) cuyas proteínas precursoras son la  $\alpha_{S1}$ -caseína y la  $\beta$ -caseína. Siguiendo un orden decreciente en la concentración, se encuentra al péptido con un peso molecular de 1771 Da, el cual presenta actividad de acarreador de minerales y absorción de calcio, y cuya proteína precursora es la  $\alpha_{S1}$ -caseína. En menor concentración se encuentran péptidos antitrombóticos (1003.4 Da), inmunomoduladores (1201.5 Da y 1881.3 Da) y antimicrobianos (1881.3 Da).

## Péptidos identificados en queso Cotija maduro



■ 2173.7 ■ 1881.3 ■ 1771 ■ 1292.5 ■ 1201.5 ■ 1003.4 ■ 913.2 ■ 771.9 ■ 684.8

**Figura 26.** Concentración de péptidos entre 416- 4916 Da identificados en queso Cotija maduro.

**Tabla 15.** Comparación de péptidos identificados en queso Cotija maduro con los informados en la bibliografía.

Péptido	PM Informado	PM Determinado	Actividad	Proteína precursora	Fragmento	Fuente
	685	684.8	Péptido opioide	$\kappa$ - CN	34-38	20
	771	771.9	Péptido opioide	$\kappa$ - CN	33-38	20
$\alpha$ -caseína exorfina	920	913.2	Péptido opioide	$\alpha_{S1}$ - CN	90-96	18,26
	1004	1003.4	Antitrombótico	$\kappa$ - CN	103-111	18
$\beta$ -casomorfina-11	1198	1201.5	Péptido opioide, Inmunomodulador	$\beta$ - CN	60-70	36,37,38,39
$\alpha_{S1}$ -casoquinina-7	1309	1292.5	Antihipertensivo (Inhibidor de la ACE)	$\alpha_{S1}$ - CN	28-38	39
Caseinofosfopéptido	1756	1771	Acarreador de minerales, Absorción de calcio	$\alpha_{S1}$ - CN	43-58	39
	1863	1881.3	Antimicrobiano, Inmunomodulador, Antihipertensivo (Inhibidor de la ACE)	$\beta$ - CN	193-209	18,37,39
Caseinofosfopéptido	2158	2173.7	Precursor de $\beta$ -casomorfina	$\beta$ - CN	58-77	39

## VI CONCLUSIONES

Mediante el análisis de proteínas solubles se confirmó la existencia de un proceso proteolítico en el queso Cotija, observándose un aumento en la concentración de PS con la concomitante disminución de las proteínas del suero. La influencia de la temperatura en este proceso fue observada en los quesos madurados a 21°C, en los que hubo un mayor aumento en la concentración de PS, así como una mayor disminución en las proteínas del suero analizadas, en comparación con el estudio a 5°C.

Por otro lado, en quesos frescos se observó un mayor aumento en la cantidad de PS así como una mayor disminución de las proteínas del suero en comparación con los quesos maduros, hecho que puede ilustrar la influencia del  $a_w$  en la proteólisis.

Después de siete días de maduración de las diferentes muestras de queso Cotija se observó la presencia de péptidos menores a 18 000 Da, cuya generación podría estar relacionada con la disminución de las proteínas del suero analizadas (seroalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina), sugiriendo que algunos de los péptidos formados provienen de la descomposición de dichas proteínas.

Al realizar el análisis de las caseínas, se observó que la cantidad de éstas aumenta conforme lo hace el tiempo de maduración, con lo que se sugiere que el proceso proteolítico aumentó su solubilidad, haciéndolas más fácilmente extraíbles.

Se identificaron péptidos entre 416 y 4916 Da, registrándose la presencia de péptidos específicos en cada estado de maduración. Se observó que, conforme avanzaba el tiempo de maduración, la concentración de péptidos entre 3257 a 4916

Da disminuyó, mientras que la concentración de los péptidos de peso molecular entre 416-1004 Da aumentó. Al agrupar los péptidos menores a 1004 Da, se observó que su concentración aumentaba a la vez que lo hacía el tiempo de maduración, sugiriéndose así que la proteólisis en el queso ocurre en etapas: primero se verifica la hidrólisis de las proteínas a péptidos de alto peso molecular y después la hidrólisis de éstos a otros más pequeños.

En el queso fresco se encontraron diecisiete péptidos diferentes menores a 4916 Da; once de ellos coinciden con péptidos que han sido informados como bioactivos. Se identificaron péptidos acarreadores de minerales, antitrombóticos, antihipertensivos (inhibidores de la ACE), antimicrobianos e inmunomoduladores, hallándose los últimos en mayor concentración.

En el queso oreado se encontraron dieciocho péptidos diferentes menores a 4916 Da, de los cuales once de ellos, de acuerdo con lo informado en la bibliografía, fueron identificados como bioactivos. Se identificaron péptidos con actividad antitrombótica, antagonista opiode, inmunomoduladores, acarreadores de minerales y antihipertensivos (inhibidores de la ACE), estos últimos en conjunto representan la mayor cantidad de péptidos presentes en este estado de maduración.

En el queso maduro se encontraron diecisiete péptidos diferentes menores a 4916 Da, de los cuales nueve de ellos coinciden con péptidos que han sido informados como bioactivos. Se identificaron péptidos con actividad antihipertensiva, acarreadores de minerales –auxiliares en la absorción de calcio-, antitrombóticos, inmunomoduladores, antimicrobianos, siendo los péptidos identificados como opioides los que se encuentran en mayor concentración.

Durante la maduración del queso Cotija analizado se llevó a cabo un proceso proteolítico con la ulterior liberación de péptidos de bajo peso molecular, de los cuales, basándose en el tamaño y por comparación con péptidos que han sido informados como bioactivos, pudo identificarse la posible actividad biológica de 28 de ellos. Se observó que el estado de maduración en que se encuentra el queso determina el tipo de péptidos presentes.

## VII REFERENCIAS

1. Macedo Ma. Guadalupe, "Los alimentos funcionales, un reto para el siglo XXI", *Nutrición Clínica*, 5 (2002) 3.
2. Ecknard Shlimme y Wolfgang Buchheim, *La leche y sus componentes. Propiedades químicas y físicas* (Zaragoza España: Editorial Acribia, 2002), 1.
3. Alais Charles, *Ciencia de la leche principios de técnica lechera*, (México: CIA Editorial Continental, S.A. de C.V., 1970), 16-17.
4. Fox P.F y Condon J.J, *Food Proteins* (New York: Applied Science Publishers, 1982), 158-159.
5. Grappin R., Rank T.C., Olson N.F., "Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review", *Journal of Dairy Science*, 68 (1985) 531-540.
6. Fox Patrick, Guinee Timothy, Cogan Timothy, Mc Sweeney Paul H., *Fundamentals of cheese science*, (E.U.A: An Aspen Publication, 2000), 10-17, 31-39, 206-216.
7. Scott R., *Fabricación de queso* (Zaragoza: Editorial Acribia, 2002, segunda edición), 53-55.
8. Norma oficial mexicana NOM-121-SSA1-1994, Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias.
9. André Eck., *El queso* (Barcelona: Editorial Omega, S.A.,1990), 57-87.
10. Gama Ramírez R.M., Millán Luna B., Madrazo Velazquez O., García Vierna L., Chávez Mejía A., Reyes Tsuzuki G. Gómez Hernández L., Muggenburg I., *Manual de prácticas de microbiología general* (México, Laboratorio de microbiología experimental. Facultad de Química, UNAM. 2000), 222-224.
11. Fox P.F., "Proteolysis during cheese manufacture and ripening", *Journal of Dairy Science*, 72 (1989) 1379-1400.

12. Santos M.A., Villegas de Gante A., "El queso Cotija, Propuesta para su Fabricación a Partir de Leche Pasteurizada", *Lácteos y Cárnicos Mexicanos*, 12 (1997) 7-11.
13. Centeno Mónica, García Mariano, "Determinación de pH y aw en quesos mexicanos", *Tecnología de Alimentos*, 29 (1994) 34-38.
14. Gasson, M. J.; Vos, W. M. de., *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria* (Ed. Blackie Academic y Professional an Imprint of Chapman y Hall 1994), 169-210.
15. Poolman, B.; Kunji, E.R.S.; Hagting, A.; Juilliard, V.; Konings, W. N. "The proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*", *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*. 79 (1995) 65S-75S.
16. Meisel Hans, "Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potencial nutraceuticals for food and pharmaceutical applications", *Livestock Production Science*, 50 (1997) 125-138.
17. Baró L., Jiménez J., Martínez-Férez A. Y Bouza J., "Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales", *Ars. Pharmaceutica*, 42 (2001) 135-145.
18. Silva Sofia V., Malcata Xavier, "Caseins as source of bioactive peptides", *International Dairy Journal*, 15 (2005) 1-15.
19. Schanbacher F.L., Talhouk R.S., Murray F.A., "Biology an origin of bioactive peptides in milk", *Livestock Production Science*, 50 (1997) 105-123.
20. Smacchi Emanuele, Gobbetti Marco, "Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes", *Food Microbiology*, 17(2000) 129-141.
21. Korhonen Hannu, Pihlanto Anne, "Bioactive peptides: new callenges and opportunities for the dairy industry", *The Australian Journal of Dairy Technology*, 2 (2003) 129-134.
22. Shah Nagendra P., "Effects of milk-derived bioactives: an overview", *British Journal of Nutrition*, 84 (2000) Suppl.1, S3-S10.

23. Clare D.A., Swaisgood H.E., "Bioactive milk peptides: A prospectus", *Journal of Dairy Science*, 83 (1999) 1187-1195.
24. Léonil Joële, Maubois Jean Louis, "Milk derived bioactive peptides and proteins: future perspectives", Laboratoire de Recherche de Technologie Laitière 65 rue de St Rennes CEDEX.
25. Fiat Anne-Marie, Migliore-Samour Daniele, Jollés Pierre, Drouet Ludovic, Dit Sollier Claire Bal, Caen Jacques, "Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities", *Journal of Dairy Science*, 76 (1992) 301-310.
26. Meisel Hans "Milk protein derived peptides as potentially bioactive components of cheese", Federal Dairy Research Centre, Institute for Dairy Chemistry and Technology, Kiel, Germany (2002).
27. Pihlanto-Leppälä Anne, "Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE inhibitory peptides", *Trends in Food Science and Technology*, 11 (2001) 347-356.
28. Ryhänen Eeva- Liisa, Pihlanto-Leppälä Anne, Pahkala Eero, "A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties", *International Dairy Journal*, 11 (2001) 441-447.
29. Saito, T., Nakamura T., Kitazawa H., Kawai Y., Itoh T., "Isolation and structural analysis of Antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda Cheese", *Journal of Dairy Science*, 83 (2000) 1434-1440.
30. Schägger H., and Von J. G., "Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa", *Analytical Biochemistry*, 166 (1987) 368-379.
31. Chiba Hideo, Tani Fumito, "Opioid antagonist peptides derived from  $\kappa$ -casein", *Journal of Dairy Research*, 56 (1989) 363-366.
32. Lowry H., Rosebrough J., Lewis Farr A., Randall J., "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1951) 265-275.

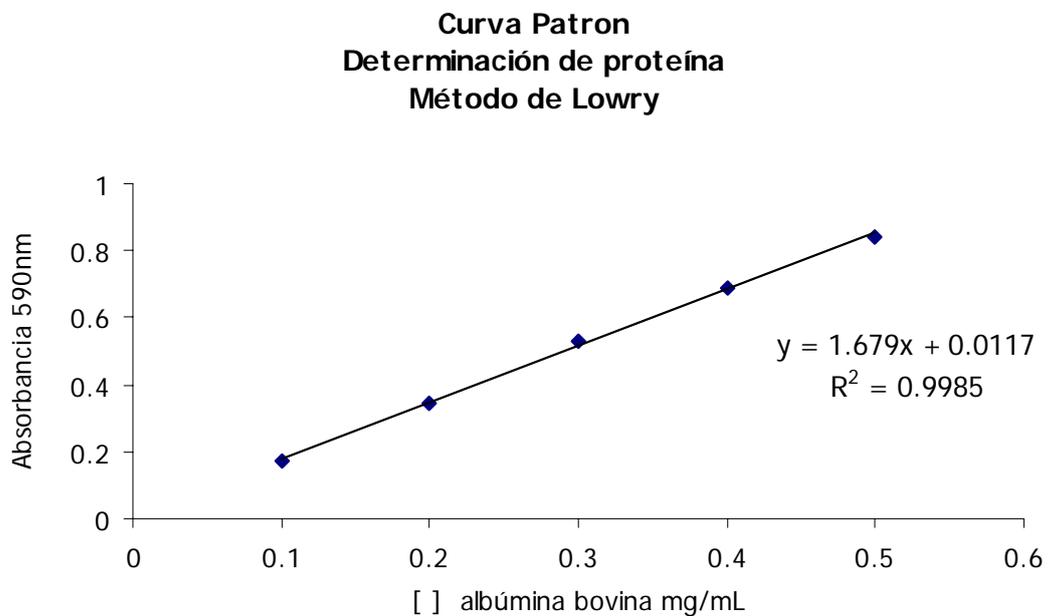
33. Pinto Covarruvias, Vega y León Salvador. ***Métodos de análisis de la leche y derivados*** (Chile 1998. UAM), 443.
34. Yong K. Jin and Young W. Park, "SDS-PAGE of proteins in goat milk cheeses ripened under different conditions", ***Journal of Food Science***, 61 (1996) 490-494.
35. Fiat Anne Marie, Toledano Levy Silvine, Caen P Jacques, Jolles Pierre, "Biological active peptides of casein and lactotransferin implicated in platelet function", ***Journal of Dairy Research***, 56 (1989) 351-355.
36. Bio-Rad Laboratories. Instruction Manual. Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell. pp 1-25.
37. Meisel Hans, Bockelmann Wilhelm, "Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties", ***Antonie van Leeuwenhoek***, 76 (1999) 207-215.
38. Harsharnjit S. Gill, Doull f., Rutherford K.J., Cross M.L., "Immunoregulatory peptides in bovine milk", ***British Journal of Nutrition***, 84 (2000) Suppl.1, S111-S117.
39. Rokka T., Syväoja Eeva-Liisa, Tuominen Jari, Coronen H., "Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of Lactobacillus GG fermented UHT milk", ***Milchwissenschaft***, 52(12) (1997) 675-678.
40. Eryck R. Silva Hernández, Iñigo Verdalet Guzmán, "Revisión: alimentos e ingredientes funcionales derivados de la leche", ***Archivos Latinoamericanos de Nutrición***, 53 n.4 (2003).

## VIII ANEXO

### A) Método de Lowry<sup>32</sup>

Procedimiento:

1. Mezclar 50 volúmenes de A + 1B+ 1C.
2. 1 mL de muestra + 5 mL de la mezcla.
3. Dejar 10 minutos en la oscuridad.
4. Agregar 0.5mL del reactivo D.
5. Dejar 30 minutos en la oscuridad.
6. Leer a 590 nm.



## B) Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE nativa, SDS-PAGE, Tris-SDS-PAGE) <sup>30, 40</sup>

En electroforesis PAGE la composición de las soluciones stock y de todos los geles está definida por las letras T y C, en donde T representa la concentración total en porcentaje de ambos monómeros (acrilamida y bisacrilamida) y C representa la concentración, en porcentaje, de entrecruzamientos en relación con la concentración total:

$$\%T = \frac{g \text{ acrilamida} + g \text{ bis - acrilamida}}{\text{volumen total}} \times 100$$

$$\%C = \frac{g \text{ bis - acrilamida}}{g \text{ acrilamida} + g \text{ bis - acrilamida}} \times 100$$

Procedimiento:

1. Montar el equipo para electroforesis Mini Protean II de acuerdo con lo indicado por el proveedor (Bio-Rad).
2. Tanto el gel de separación como el de concentración se prepararon de acuerdo con la T requerida y el tipo de electroforesis que se debía llevar a cabo.
3. Al mismo tiempo de cargar y correr las muestras en los geles electroforéticos se cargó y corrió el estándar correspondiente a cada caso.
4. La corrida del gel en el caso de PAGE nativa y SDS-PAGE comienza a 200 Volts (V), manteniéndose constantes durante aproximadamente 1h. Para el caso de Tris-SDS-PAGE se inicia la corrida a 30 V y, una vez que las muestras han dejado el gel de concentración, el voltaje se aumenta a 95 V durante aproximadamente 4 h.

5. Desmontar cuando las muestras alcancen la frontera inferior de las placas y teñir los geles de acuerdo con el tipo de electroforesis realizado; posterior a su tinción, los geles son enjuagados con agua desionizada.
6. Tomar imagen en Gel-Doc 1000 de Bio-Rad.

#### B.1) Preparación de reactivos y geles para PAGE nativa y SDS-PAGE

##### Solución stock acrilamida/bisacrilamida T= 30 %, C= 2.67 %

Para 100 mL de solución

Acrilamida	29.2 g
N', N'-bis-metilenacrilamida	0.8 g

##### Buffer Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8

Para 100 mL

Tris	18.15 g
HCl 6 N	

##### Buffer Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8

Para 100 mL

Tris	6 g
HCl 6 N	

SDS 10 % (p/ v)

Buffer de la muestra

Agua desionizada	3.8 mL
Buffer Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	1 mL
Glicerol	0.8 mL
SDS al 10 %	1.6 mL
2-mercaptoetanol	0.4 mL
Azul de bromofenol al 1%	0.4 mL

Buffer de corrida 5X, pH 8.3

Para 1L

Tris base	15 g
Glicina	72 g
SDS	5 g

Gel de concentración T= 4 %

Solución stock acrilamida/bisacrilamida T= 30 %	0.53 mL
Buffer Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	3.47 mL
SDS al 10 %	40 µL
Persulfato de amonio al 10 % en buffer de pH 6.8	20 µL
TEMED	2 µL

### Gel de separación T= 12.5 %

Solución stock acrilamida/bisacrilamida T= 30 %	3.33 mL
Buffer Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	4.67 mL
SDS al 10 %	80 µL
Persulfato de amonio 10 % en buffer de pH 8.8	40 µL
TEMED	4 µL

### Solución teñidora

- Azul de Coomassie
- Sypro Orange

En la misma forma que para Tris-SDS-PAGE

### Solución desteñidora

Agua desionizada	83 %
Metanol	10 %
Ácido acético	7 %

### B.2) Electroforesis Tris-SDS-PAGE para péptidos

### Solución stock acrilamida/bisacrilamida T= 49.5 %, C= 6 %

Para 100 mL de solución

Acrilamida	46.5 g
N',N'-bis-metilenacrilamida	3 g

### Buffer Tris 3 M, pH 8.45

Para 100 mL

Tris 36.3 g

HCl 6 N

### Buffer de la muestra

Agua desionizada 3.8 mL

Buffer de pH 6.8 1 mL

Glicerol 0.8 mL

SDS al 10 % 1.6 mL

$\beta$ -mercaptoetanol 0.4 mL

Azul de bromofenol 0.4 mL

### Buffer de corrida 1X

Tricina 5.37 g

Tris 3.63 g

SDS 0.3 g

### Gel de concentración 4 %

Solución stock acrilamida/bisacrilamida T= 49.5 % 0.32 mL

Buffer Tris 3 M, pH 8.45 3.68 mL

SDS al 10 % 40  $\mu$ L

Persulfato de amonio al 10 % en buffer de pH 8.45 20  $\mu$ L

TEMED 2  $\mu$ L

Gel de separación T= 20 %

Solución stock acrilamida/bisacrilamida, 49.5 %	3.23 mL
Buffer Tris 3 M, pH 8.45	4.73 mL
SDS al 10 %	160 µL
Persulfato de amonio al 10 % en buffer de pH 8.45	35 µL
TEMED	5 µL

Solución fijadora

Metanol	50 %
Ácido acético	10 %
Agua desionizada	40 %

Solución teñidora

Sypro Orange (Bio-Rad)	5 µL
Ácido acético al 7.5 %	25 mL

Después de 30 minutos enjuagar con agua desionizada

### Estándar de peso molecular para SDS-PAGE amplio rango

Proteína	Peso molecular (Da)
Miosina	200,000
$\beta$ -galactosidasa	116,250
Fosforilasa b	97,400
Seroalbúmina	66,200
Ovalbúmina	45,000
Anhidrasa carbónica	31,000
Inhibidor de tripsina	21,500
Lisozima	14,400
Aprotinina	6,500

### Estándar de polipéptidos para SDS-PAGE

Proteína	Peso molecular (Da)
Trifosfato isomerasa	26,625
Mioglobina	16,950
$\alpha$ -lactoalbúmina	14,437
Aprotinina	6,512
Insulina b, oxidasa	3,496
Bacitracina	1,423