



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

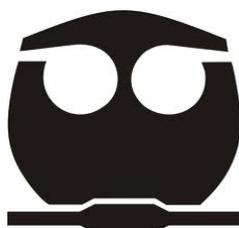
*“ANÁLISIS DE PÉPTIDOS LIBERADOS DURANTE LA
MADURACIÓN DEL AUTÉNTICO QUESO COTIJA”.*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

MARÍA IVETTE RANGEL DEL VALLE



MEXICO, D.F.

2010.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Profra. María Elena Cañizo Suárez
VOCAL: Profra. Amelia María de Guadalupe Farrés González Saravia
SECRETARIO: Profra. Judith Jiménez Guzmán
1^{er} SUPLENTE: Profra. Maricarmen Quirasco Baruch
2^o SUPLENTE: Prof. Hugo Blancas Morales

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

PLANTA PILOTO II, DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Asesor del Tema:

Dra. Judith Jiménez Guzmán

Asesor Técnico:

Dr. José Mariano García Garibay

Sustentante:

María Ivette Rangel del Valle

*Es maravilloso Dios,
tener tan poco que pedir,
y tanto que agradecer.*

DEDICATORIAS

Antes, creía que el valor de los triunfos se aquilataba por lo que se había tenido que sacrificar para obtenerlos. Hoy día sé que la vida es invaluable... con amor para la estrella que siempre está conmigo.

A un ángel llamado Hilda Celeste, la mejor mamá del universo y mi mayor bendición:

Mamita, este día tan especial en nuestras vidas, es un logro de ambas, pues aunque tú no estudiaste química ¡hoy te gradúas conmigo!; sabes que sin tu infinito apoyo, hoy este logro no sería una realidad y créeme que no existen palabras que expresen mi agradecimiento, por todo el amor con que me has alentado y guiado día a día.

Tú has sido mi mayor incentivo para seguir adelante, pese a todas las adversidades tú jamás flaqueaste. Solo Dios sabe cuantas cosas hemos vencido juntas y solo puedo recordar que nunca he estado sola, por que tú siempre has estado a mi lado, aún en los momentos que me hicieron sentir que jamás volvería a ser feliz.

Hoy quiero felicitarte por ser una gran mujer y un gran ser humano con el cual toda la vida estaré eternamente agradecida...

Por ser el ángel que aceptó ser mi mamá.

Por ser el sol que me alumbró el camino cuando estaba en medio de la tempestad y cuando las adversidades de la vida me hicieron madurar.

Por todo tu apoyo, comprensión, orientación y consejos.

Por haberme enseñado que la conducta de otras personas, jamás debe condicionar la mía.

Por ser mi amiga, antes que mi madre y brindarme toda tu confianza y amor.

Por enseñarme a mirar siempre el lado positivo de las cosas.

Por hacerme libre, enseñándome el significado del perdón.

Por mostrarme que los fracasos son solo oportunidades para ser mejor cada día.

Por hacer de mí una mujer integra, inteligente, justa, humilde y fuerte.

Por enseñarme lo poderoso que es el pensamiento y una actitud positiva ante cualquier situación.

Por no claudicar nunca, ante las adversidades.

Por ayudarme y enseñarme a librar apogios para ser feliz y libre.

Por enseñarme a perseguir y alcanzar mis sueños hasta hacerlos una realidad.

Por amarme por sobre todo.

Porque en todo momento siempre creíste en mí.

Y aunque no tengo palabras que describan mi gratitud por tanto amor. Solo me resta decirte: "Eres la mejor" y este logro es de ambas.

¡Te amo mucho Maaa!

A mi papá:

¿Sabes? no sé en qué momento nos distanciamos tanto, supongo que ha sido difícil para ambos. Te confieso, que me hiciste mucha falta, y sin embargo agradezco a Dios por habernos dado la oportunidad de acercarnos y demostrarnos lo mucho que nos queremos y que el amor de padre e hija puede vencer cualquier cosa; por eso en este día tan anhelado para ambos, no podía dejar de decirte:

Gracias por quererme cuando menos lo merezco, porque es cuando más lo necesito.

Gracias por abrazarme en los momentos más difíciles de mi vida, pesé a todos sentimientos encontrados hacia mí.

Gracias por demostrarme que el amor de un padre es algo que no cambia, ni deja de existir, haga lo haga y pase, lo que pase; porque ahora sé, que tú siempre vas a amarme.

Gracias por haber cuidado de mí cuando mi mamá no estaba. ¡Fuiste la fuerza para continuar!

Gracias por darme la vida y por ser mi padre.

Te amo papá.

Al amor de mi vida, Gerardo Cangas:

Cariño, gracias por todos los momentos vividos; por compartir la vida con alguien como yo y experimentar todos y cada uno de los matices del amor.

Gracias por soñar despiertos, por ilusionarte, por reír, por llorar, por la ausencia, por “estar”, por los triunfos y fracasos compartidos, por madurar y crecer juntos a través del tiempo.

Gracias por conocerme, desconocerme y a pesar de ello amarme.

Te amo y sé que soy afortunada de tenerte en mi vida, gracias por existir.

A mis hermanos:

A ti Gaby, por ser mi amiga, mi cómplice y confidente en los momentos más felices y difíciles de mi vida, por escucharme y alentarme a seguir adelante. Pero sobre todo por “estar ahí” y defender a tu hermanita, cuando más lo necesitaba.

A ti Ale, por demostrarme tu cariño, por apoyarme, quererme y regalarme a mi Chocolatita hermosa.

Gracias a los dos, por ser solidarios conmigo y por demostrarme lo fuerte y valioso que es el amor y apoyo entre hermanos. ¡Los quiero mucho!

A mis sobrinos:

Alita, Dany, Matis, Ale, Michelin y Andy.

Gracias por ser parte de mi vida, los quiero.

A Vania:

Mi amiga y hermana, quien ha compartido conmigo tantas y tantas cosas, que ni en sueños hubiésemos podido imaginar. Juntas, nos hemos visto crecer la una a la otra y nos hemos apoyado a lo largo de los años, en esos tiempos en que la vida nos convirtió de niñas a mujeres en los cuales sin duda hemos vivido alegrías y sin sabores. Es por eso que hoy no podía dejar de agradecerte por todo esas experiencias compartidas y reiterarte de todo corazón que tú y ahora también mi ahijado Santi, cuentan conmigo para siempre. ¡Los quiero mucho!

A Manuel:

Gracias por ser un amigo incondicional de toda la vida.

A todos mis familiares:

Por brindarme su apoyo, ayuda invaluable e infinito amor, gracias familia. ¡Los quiero mucho a todos!

A la Familia Cangas Hernández:

Por abrirme las puertas de su hogar y de su corazón, por todas sus atenciones pero sobre todo por hacerme sentir parte de su familia. ¡Mil gracias por todo los quiero mucho!

A mis amigos de la Facultad:

Paola, Ranferi, Fabián, Toño, Jenny, Neto, Olga, Enrique, Roció, Marquelia, Gabo, Yevgenia, Lucy, Abril, Claudia, Chío, Aarón, Víctor, Odín, Omar, Memo, Marco, Luis, Nancy, Noé y a todos los que de una u otra forma son parte de una de las etapas más bonitas de mi vida, les agradezco a todos por compartir conmigo los momentos más bellos e inolvidables de este maravilloso tiempo de estudiante.

A mis hermanos de Marinela México:

Laurita, gracias por todos los momentos compartidos llenos de sentimientos, risas, anhelos, llanto, emoción y complicidad que vivimos en Marinela. Te agradezco por haberme ayudado a crecer y por ese apoyo incondicional que me alentó en todo momento hacia los nuevos retos, ahora que estamos en diferentes caminos te extraño mucho amiga, sin embargo sé, que esta bonita amistad, será para toda la vida.

Daner, mi hermano pequeño de Marinela, tan solidario, inteligente, alegre y como siempre decía tu madre... tan servicial. Muchas gracias por todo los buenos y malos ratos que vivimos en la planta, incluso por las desveladas laborales muestreando en línea, sin tu apoyo y carisma nada hubiera sido igual.

Hugo, gracias por las experiencias y logros que vivimos juntos en cada Kaizen, me da gusto saber que lo que aprendimos rindió frutos.

¡Los quiero mucho!

A mi querido amigo Víctor Estrada:

Gracias por todos los consejos y las pláticas, por compartir tu tiempo y ayudarme a crecer como persona y profesionalmente; te agradezco mucho por el apoyo y la amistad incondicional que formamos en este tiempo. Sin ti, los Kaizenes y las parodias de los mismos no hubieran sido iguales.

A todos los amigos de Marinela que laboran en diferentes departamentos: Mantenimiento, Producción, Calidad Total, Sanidad, Materias Primas, Comedor, Aseguramiento de Calidad, Recursos Humanos:

Agradezco a Dios por haberlos puesto en mi camino y haberme permitido aprender de cada uno de ellos y compartir un sin fin de anécdotas que me hicieron crecer y enriquecerme como persona. Gracias por las enseñanzas, apoyo y por todos sus buenos deseos y bendiciones que iluminan mi camino a donde quiera que voy. ¡Los quiero Marinelos!

A mis amigos de EPM:

Nacho, Heriberto (mis hermanos de padre), Miguel Gallardo (líder y ejemplo), Berenice, José Luis, Freddy, Chayo, Moi, Edgar, Humberto, por su apoyo y amistad, me da gusto saber que llegue a un buen lugar de trabajo donde tengo en quien confiar.

A los Gung Ho de EPM que ahora son parte de la Mejora Continua de mi Vida:

Andrea, Raúl, Nacho, Edgar, José Luis, Oscar P., César, Jorge L., Federico, Oscar B., Sergio, Jorge T. y Garibay por dejarme conocerlos y alentarme a seguir promoviendo la mejora. Me llena de felicidad saber que siendo tan diferentes, todos somos aliados para lograr el cambio.

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por la dicha de la vida y la salud, la fortuna de una hermosa familia y la bendición de contar con amigos.

A Mis Padres:

Por estar siempre a mi lado, amarme y haberme dado la vida.

A la Máxima Casa de Estudios:

Por formarme como profesionista y darme el orgullo de ser universitaria.

A la Dra. Judith Jiménez Guzmán, mi asesora:

Por el apoyo para la realización de este trabajo, mi más sincero agradecimiento por su enseñanza, ayuda, disposición y tiempo dedicado. Sin tu ayuda no hubiera sido posible la culminación de este trabajo. Muchas gracias Judith.

Al Dr. José Mariano García Garibay, mi asesor técnico:

Por su asesoría y orientación para la realización de este trabajo.

A la Dra. Amelia María de Guadalupe Farrés González Saravía:

Agradezco haber dedicado su tiempo y disposición en la revisión de este trabajo, sus observaciones y sugerencias fueron muy importantes para la mejora del mismo.

A la Dra. María Elena Cañizo Suárez:

Muchas gracias por su atención, tiempo y disponibilidad para la revisión de este trabajo.

A la Universidad Autónoma Metropolitana:

Por abrirme cordialmente sus puertas para poder desarrollar este proyecto de tesis.

A todo el personal de la Planta Piloto II, Depto. de Biotecnología de la UAM:

Por ayudarme cuando lo necesite y por compartir conmigo sus instalaciones.

Índice

I. Resumen	1
II. Introducción	5
III. Antecedentes	7
III.1. Leche	7
III.1.2. Composición Química de la Leche.....	7
III.1.3. Proteínas de la Leche	9
III.1.3.1. Caseínas.....	10
III.1.3.2. Proteínas del Suero	13
III.2. Queso	14
III.2.1. Proceso de Maduración	16
III.2.2. Glicólisis.....	16
III.2.3. Proteólisis	20
III.2.4. Lipólisis.....	23
III.3. Actividades Biológicas de los Péptidos Bioactivos Lácteos	25
III.3.1. Actividad antihipertensiva (péptidos inhibidores de la ACE).....	26
III.3.2. Actividad quelante de minerales.....	28
III.3.3. Actividad opiácea	29
III.3.4. Actividad inmunomodulante.....	30
III.3.5. Actividad antimicrobiana.....	31
III.3.6. Actividad antitrombótica	31
III.4. Historia de la Sierra de Jalmich y del auténtico queso Cotija	32
III.4.1. Delimitación de la zona de producción del queso Cotija: la Sierra de Jalmich.....	35
III.4.2. Definición del Auténtico Queso Cotija.....	37
III.4.3. Proceso de elaboración del Auténtico Queso Cotija.....	38

IV. Objetivos	41
IV.1. Objetivo General.....	41
IV.2. Objetivo Específico.....	41
IV. Hipótesis	42
VI. Metodología	43
VI.1. Diagrama General.....	43
VI.2. Origen de las Muestras.....	44
VI.3. Situación Geográfica de las Muestras.....	45
VI.4. Obtención de los Extractos Proteínicos.....	46
VI.4.1. Extracción de Proteínas Solubles.....	46
VI.4.2. Extracción de Proteínas Totales.....	46
VI.5. Determinación de Proteína por el Método de Lowry.....	47
VI.6. Maduración de Muestras.....	48
VI.7. Técnicas Electroforéticas.....	49
VI.7.1. Electroforesis Nativa en gel de poliacrilamida.....	49
VI.7.2. Electroforesis de péptidos.....	51
VI.8. Determinación de Actividad Antihipertensividad en Extractos Proteínicos.....	54
VII. Resultados y Discusión	57
VII.1. Determinación del contenido de proteína obtenido por el método de Lowry a diferentes condiciones de maduración.....	57
VII.2. Determinación de péptidos por electroforesis en los Auténticos quesos Cotija.....	62
VII.2.1. Electroforesis Nativa de los extractos proteínicos de las muestras en la etapa inicial de su maduración.....	62
VII.2.2. Determinación de péptidos generados a diferentes tiempos y temperaturas de maduración.....	63
VII.2.3. Determinación de los pesos moleculares encontrados al inicio de la maduración.....	63

<i>VII.2.4. Determinación de los pesos moleculares encontrados durante el tiempo de maduración por 2 semanas a Temperatura Ambiente (21 °C).....</i>	66
<i>VII.2.5. Determinación de los pesos moleculares encontrados después de la maduración por 2 semanas a Temperatura de Refrigeración (4 °C).....</i>	68
<i>VII.2.6. Determinación de los pesos moleculares encontrados después de madurar por 6 meses a Temperatura de Refrigeración (4 °C).....</i>	70
<i>VII.3. Relación de péptidos encontrados en los quesos estudiados a diferentes temperaturas de maduración y su concordancia con péptidos bioactivos reportados, con base en el peso molecular determinado.....</i>	77
<i>VII.3.1. Queso 1 “Cotija Rancho el Lorenzo”.....</i>	78
<i>VII.3.2. Queso 2 “Cotija Rancho Piedra Amarilla”.....</i>	80
<i>VII.3.3. Queso 3 “Cotija Rancho el Lourdes”.....</i>	82
<i>VII.3.4. Queso 4 “Cotija Rancho el Lourdes”(lavado cada mes con sal y vinagre durante los tres primeros meses a su elaboración).....</i>	85
<i>VII.5. Determinación de la Actividad inhibitoria de la ECA en los auténticos quesos Cotija madurados por 6 meses a temperatura de refrigeración (4 °C).....</i>	91
VIII. Conclusiones.....	97
IX. Perspectivas.....	99
X. Bibliografía.....	101
XI. Anexos.....	107
<i>XI.1.1. Preparación de soluciones para extracción de proteína.....</i>	107
<i>XI.1.1. Buffer de fosfatos 0.1M a pH 7.....</i>	107
<i>XI.1.2. Solución de HCl 1.5M.....</i>	107
<i>XI.1.3. Solución de Urea 8M a pH 8.....</i>	107
<i>XI.2. Preparación de soluciones para el método de Lowry.....</i>	108
<i>XI.2.1. Solución A (Carbonato de Sodio al 2% en Hidróxido de Sodio al 0.1N).....</i>	109

<i>XI.2.2.Solución B (Sulfato de Cobre al 1%).....</i>	<i>109</i>
<i>XI.2.3.Solución C (Tartrato de Sodio al 2%).....</i>	<i>109</i>
<i>XI.2.4.Solución D (Reactivo de Folin 1:1).....</i>	<i>109</i>
<i>XI.3.Soluciones para electroforesis.....</i>	<i>110</i>
<i>XI.3.1.Electroforesis Nativa.....</i>	<i>110</i>
<i>XI.3.2.Electroforesis de Péptidos.....</i>	<i>113</i>
<i>XI.4.Estándares utilizados para electroforesis.....</i>	<i>115</i>
<i>XI.4.1.Estándares de bajo rango.....</i>	<i>115</i>
<i>XI.4.2.Estándares de polipéptidos.....</i>	<i>115</i>
<i>XI.5.Curvas patrón.....</i>	<i>116</i>
<i>XI.5.1.Curva patrón para la determinación de P.M. de péptidos al inicio de la maduración.....</i>	<i>116</i>
<i>XI.5.2.Curva patrón para la determinación de pesos moleculares de péptidos durante la cinética de maduración 2 semanas a temperatura ambiente (21 °C).....</i>	<i>116</i>
<i>XI.5.3.Curva patrón para la determinación de pesos moleculares de péptidos durante la cinética de maduración 2 semanas a temperatura de refrigeración (4 °C).....</i>	<i>117</i>
<i>XI.5.4.Curva patrón para la determinación de pesos moleculares de los péptidos del suero encontrados después de madurar 6 meses a temperatura de refrigeración (4 °C).....</i>	<i>117</i>
<i>XI.5.5.Curva patrón para la determinación de pesos moleculares de los péptidos de la fracción caseínica encontrados después de madurar 6 meses a temperatura de refrigeración (4 °C).....</i>	<i>118</i>
<i>XI.6.Soluciones para la determinación de la actividad antihipertensiva.....</i>	<i>118</i>
<i>XI.6.1.Solución de NaOH 10N.....</i>	<i>118</i>
<i>XI.6.2.Buffer de Boratos 0.1M, pH8.3; 0.3 M de NaCl.....</i>	<i>118</i>
<i>XI.6.3.Buffer de Boratos 0.1M, pH8.3; 0.3 M de NaCl con sustrato HHL.....</i>	<i>118</i>

Índice de Tablas

<i>Tabla 1. Composición general de la leche de vaca</i>	<i>7</i>
<i>Tabla 2. Caseínas primarias y su composición</i>	<i>10</i>
<i>Tabla 3. Productores de los auténticos queso Cotija</i>	<i>44</i>
<i>Tabla 4. Forma de preparación de muestras para la determinación del porcentaje de inhibición de la ECA en los quesos Cotija</i>	<i>55</i>
<i>Tabla 5. Comparación del contenido de proteína obtenido por Lowry a diferentes tiempos y temperaturas de maduración.....</i>	<i>58</i>
<i>Tabla 6. Pesos moleculares de péptidos entre el rango de 6 500 a 450 Da encontrados en los auténticos quesos Cotija durante el revelado del gel de electroforesis al inicio de la maduración.....</i>	<i>65</i>
<i>Tabla 7. Pesos moleculares de péptidos entre el rango de 6 500 a 450 Da encontrados en los auténticos quesos Cotija durante el revelado del gel de electroforesis después de madurar 2 semanas a temperatura ambiente (21 °C).....</i>	<i>67</i>
<i>Tabla 8. Pesos moleculares de péptidos entre el rango de 6 500 a 450 Da encontrados en los auténticos quesos Cotija durante el revelado del gel de electroforesis después de madurar 2 semanas a temperatura de refrigeración (4 °C).....</i>	<i>69</i>
<i>Tabla 9. Pesos moleculares de péptidos entre el rango de 6 500 a 450 Da encontrados en los auténticos quesos Cotija durante el revelado del gel de electroforesis después de madurar 6 meses a temperatura de refrigeración (4 °C).....</i>	<i>71</i>
<i>Tabla 10. Comparativo en base al pesos moleculares determinado de los péptidos solubles localizados a diferentes condiciones de temperatura y tiempo experimentados en el presente estudio vs. los péptidos bioactivos reportados en la literatura.</i>	<i>87</i>
<i>Tabla 11. Comparativo en base al pesos moleculares determinado de los péptidos totales localizados a diferentes condiciones de temperatura y tiempo experimentados en el presente estudio vs. los péptidos bioactivos reportados en la literatura.....</i>	<i>89</i>
<i>Tabla 12. Actividad inhibitoria de la ECA (%), nitrógeno total de los extractos de proteína soluble y total suero de los quesos Cotija madurados a temperatura de refrigeración (4 °C) por 6 meses.....</i>	<i>94</i>

Índice de Figuras

<i>Figura 1. Metabolismo de los carbohidratos.....</i>	17
<i>Figura 2. Metabolismo homofermentativo de los azúcares</i>	18
<i>Figura 3. Metabolismo heterofermentativo de los azúcares</i>	19
<i>Figura 4. Metabolismo de las proteínas</i>	20
<i>Figura 5. Sistema renina-angiotensina y quinina-calcreína. Acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).....</i>	27
<i>Figura 6. Queso tipo Cotija artesanal, un queso Cotija y un queso tipo Cotija (industrial).....</i>	33
<i>Figura 7. Mapa de zona de producción del queso Cotija, según definida por las reglas de uso de la marca colectiva queso “Cotija de región de origen”</i>	36
<i>Figura 8. Diagrama de elaboración del auténtico queso Cotija</i>	40
<i>Figura 9. Separación de péptidos por electroforesis nativa de extractos de proteína total y proteína soluble encontrados al inicio de la maduración.....</i>	62
<i>Figura 10. Separación de péptidos en gel de poliacrilamida T=18 %, C=6% encontrados al inicio de la maduración de los quesos Cotija</i>	65
<i>Figura 11. Separación de péptidos en gel de poliacrilamida T=18 %, C=6% encontrados después de madurar 2 semanas a temperatura ambiente (21 °C) los quesos Cotija.....</i>	66
<i>Figura 12. Separación de péptidos en gel de poliacrilamida T=18 %, C=6% encontrados después de madurar 2 semanas a temperatura a 4 °C) los quesos Cotija</i>	69
<i>Figura 13. Separación de péptidos de proteínas de proteína total en gel de poliacrilamida T=20 %, C=6% después de 6 meses de maduración a temperatura de refrigeración (4 °C) de los quesos Cotija.....</i>	70
<i>Figura 14. Separación de péptidos de proteína soluble en gel de poliacrilamida T=20 %, C=6% después de 6 meses de maduración a temperatura de refrigeración (4 °C) de los quesos Cotija.....</i>	71

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Ilustración de la comparación del contenido de proteína obtenido por Lowry a diferentes tiempos y temperaturas de maduración	60
Gráfico 2. Péptidos encontrados en proteína soluble y total en el Queso del Rancho El Lorenzo	72
Gráfico 3. Péptidos encontrados en proteína soluble y total en el Queso del Rancho Piedra Amarilla	73
Gráfico 4. Péptidos encontrados en proteína soluble y total en el Queso del Rancho Lourdes	74
Gráfico 5. Péptidos encontrados en proteína soluble y total en el Queso del Rancho Lourdes (con lavados de sal y vinagre).....	75
Gráfico 6. Espectros de Absorbancia del efecto inhibidor de los extractos de proteína soluble de los auténticos quesos Cotija, en la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) medido como el índice de hidrólisis del Hipuril-L-Histidil-L-Leucina.....	92
Gráfico 7. Espectros de Absorbancia del efecto inhibidor que causan los extractos de proteína total de los auténticos quesos Cotija en la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) medido como el índice de hidrólisis del Hipuril-L-Histidil-L-Leucina.....	93

I. Resumen

El auténtico queso Cotija tiene ciertas características comunes en los productos con denominaciones de origen: una historia, una cultura (la cultura ranchera), un territorio delimitado (la sierra Jalmich), un saber-hacer local con raíces territoriales profundas, una reputación. Hoy día este queso es el primer producto alimenticio procesado artesanalmente que ostenta una marca colectiva en México, además de haber sido reconocido entre 500 participantes como el mejor “queso extranjero del año” en el campeonato mundial de quesos de calidad que se realizó en Cremona, Italia a finales del 2006. Sin embargo este producto, como muchos otros productos alimenticios elaborados de manera artesanal en México, no ha sido estudiado a fondo y se carece de información que lo describa a profundidad.

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de la región en que se elaboran los quesos Cotija originales en la proteólisis que se lleva a cabo durante la maduración del queso y su repercusión en la liberación de péptidos con posible actividad biológica.

Se analizaron cuatro quesos, los cuales se adquirieron durante la VII feria regional del queso Cotija, los días 26 al 30 de Diciembre del 2006. Cada queso fue elaborado en un rancho diferente por lo que las muestras difieren en cuanto a situación geográfica y microclimas característicos de la Sierra de Jalmich. Al comienzo del estudio los quesos contaban con tres meses de maduración. Para determinar si en ellos se presentaba un proceso proteolítico, se comparó la cantidad de proteína extraíble en el queso madurado (etapa inicial); 2 semanas y 6 meses después de madurar (etapa final) tanto a temperatura ambiente (21°C) como a temperatura de refrigeración para verificar el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre el proceso proteolítico.

El proceso proteolítico fue evaluado determinando la concentración de proteína en extractos de proteína soluble y proteína total mediante la técnica de Lowry. Se observó que el contenido de proteína aumentó después de 2 semanas a las dos temperaturas probadas, confirmando que sí se presenta actividad proteolítica en los quesos. Más aún, se observó que en todos los casos las reacciones enzimáticas se inhiben a bajas temperaturas, sin embargo el resultado obtenido luego de 6 meses de refrigeración mostró una mayor cantidad de proteína extraíble que en la etapa inicial de maduración, lo cual demuestra que la proteólisis continúa aunque de forma más lenta en comparación con las primeras dos

semanas, sugiriendo que la actividad enzimática se ve disminuida por la baja temperatura aunque no llega a desaparecer.

Simultáneamente al efecto de la temperatura, se llevó a cabo un estudio de la descomposición de las proteínas presentes por electroforesis en gel de poliacrilamida. El perfil peptídico determinado, mostró que la hidrólisis de proteínas da lugar a péptidos de alto peso molecular (arriba de 5 000 Da), seguido de la formación de péptidos de peso intermedio (2 000-5 000 Da), y finalmente se forman péptidos de bajo peso molecular (menores a 1 000 Da). El peso molecular de los péptidos encontrados se comparó con los reportados en la literatura para péptidos bioactivos, encontrándose que al parecer los caseinofosopeptidos con actividad biológica transportadora de minerales y péptidos antihipertensivos pueden ser los que se encuentren en mayor proporción en las muestras analizadas de queso Cotija. Así mismo en la siguiente tabla se presentan los péptidos con posible actividad biológica encontrados luego de 6 meses de madurar a temperatura de refrigeración cada una de las muestras.

QUESO I RANCHO EL LORENZO					
Extracto de Proteína	Peso Molecular aproximado encontrado (Da)	Peso Molecular reportado (Da)	Posible Péptido	Posible Bioactividad	Referencia
Proteína Soluble	2620.59	2607.8	Caseinofosopéptido	Transportador de Minerales	Smacchi y Gobetti 2000
	1223.77	1234	Caseinofosopéptido	Transportador de Minerales Inmunomodulador	Meisel 1999
		1251.6	Casoxina C	Antagonista opioide Antihipertensivo	
Proteína Total	2819.68	2803.2	Caseinofosopéptido α -Caseinofosfato	Transportador de Minerales Absorción de calcio, Antihipertensivo	Meisel 1999
		2811	Caseinofosopéptido	Antihipertensivo	
	2312.06	2321.5	Caseinofosopéptido α_1 β_1 -Caseinofosfato	Transportador de Minerales, Absorción de Calcio	Meisel 1999
		2340.7	Caseinofosopéptido	Transportador de Minerales	Clare y Swaisgood 2000
	1556.68	1536		Antihipertensivo	Saito y col. 2000
		1551.9	Caseinofosopéptido	Inmunomodulador	
	1276.44	1251.6	Casoxina C	Antagonista opioide Antihipertensivo	Meisel 1999
		1271	Casoplatelina	Antitrombótico, Antimicrobiano	Meisel 1999
		1292.5	α_{S1} -Casokinina-7	Antihipertensivo	Eryck y col. 2003

QUESO 2 RANCHO PIEDRA AMARILLA					
Extracto de Proteína	Peso Molecular aproximado encontrado (Da)	Peso Molecular reportado (Da)	Posible Péptido	Posible Bioactividad	Referencia
Proteína Soluble	3026.91	3002.5	Caseinofosfopéptido	Transportador de Minerales	Silva y Malcata 2005 Smacchi y Gobbetti 2000
	1711.2	1756	Caseinofosfopéptido	Transportador de Minerales, Absorción de calcio	
Proteína Total	2312.06	2321.5	Caseinofosfopéptido α_1 -Caseinofosfato	Transportador de Minerales, Absorción de Calcio	Smacchi y Gobbetti 2000 Meisel 1999 Clare y Swaisgood 2000
		2340.7	Caseinofosfopéptido	Transportador de Minerales	Smacchi y Gobbetti 2000 Clare y Swaisgood 2000
	1156.38	1156.3	β -casokinina-10	Antihipertensivo	Meisel 1999 Harsharnjit y col. 2000
	1276.44	1251.6	Casoxina C	Antagonista opioide Antihipertensivo	Meisel 1999 Rokka y col. 1997
		1271	Casoplatelina	Antitrombótico,	Meisel 1999
1292.5		α_1 -Casokinina-7	Antihipertensivo	Eryck y col. 2003	

QUESO 3 RANCHO LOURDES					
Extracto de Proteína	Peso Molecular aproximado encontrado (Da)	Peso Molecular reportado (Da)	Posible Péptido	Posible Bioactividad	Referencia
Proteína Soluble	4028.1	4071.5	Caseinofosfopéptido	Transportador de Minerales	Harsharnjit y col. 2000
	3026.91	3002.5	Caseinofosfopéptido	Transportador de Minerales	Smacchi y Gobbetti 2000; Silva y Malcata 2005
	1414.49	1417.6	Caseinofosfopéptido	Transportador de Minerales	Smacchi y Gobbetti 2000; Clare y Swaisgood 2000
Proteína Total	2553.88	2574		Transportador de Minerales	
	1556.68	1536		Antihipertensivo	Saito y col. 2000
		1551.9	Caseinofosfopéptido	Transportador de Minerales, Inmunomodulador	

QUESO 4 RANCHO LOURDES (lavado con sal y vinagre cada mes durante los primeros 3 meses de maduración)					
Extracto de Proteína	Peso Molecular aproximado encontrado (Da)	Peso Molecular reportado (Da)	Posible Péptido	Posible Bioactividad	Referencia
Proteína Soluble	***				
Proteína Total	2819.68	2803.2	Caseinofosfopéptido α -Caseinofosfato	Absorción mineral, Transportador de Minerales, Absorción de calcio, Antihipertensivo	Smacchi y Gobbetti 2000 Meisel 1999 Harsharnjit y col. 2000 Eryck y col. 2003
		2811	Caseinofosfopéptido	Antihipertensivo	
	1718.3	1756	Caseinofosfopéptido	Transportador de Minerales Absorción mineral., Absorción de calcio	

***No se reportaron péptidos

Al comparar los péptidos encontrados en los diferentes quesos se observó que presentan diferente peso molecular, concentración y posible actividad biológica. Esto sugiere que en todos los quesos se está llevando a cabo un proceso proteolítico; sin embargo, la especificidad de las proteasas involucradas en cada caso es diferente lo cual demuestra que la situación geográfica y los microclimas de la región en que se elaboran los quesos tiene influencia en el tipo de proteasas presentes, muy probablemente porque selecciona a diferentes microorganismos.

En última instancia se evaluó la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en los hidrolizados de proteína soluble y total obtenidos de los quesos Cotija genuinos. Los resultados pusieron de manifiesto que durante la maduración de este producto pueden llegar a formarse péptidos principalmente en los extractos solubles con una actividad inhibitoria ECA hasta del 97% (queso Cotija Rancho Piedra Amarilla) y en los de proteína total del 74% (queso Cotija Rancho Lourdes). Dado que la especie de la leche de partida, el tipo de microorganismos presentes y las condiciones del proceso de maduración pueden influir en la actividad inhibitoria de la ECA del producto final, crecen las expectativas de promover el estudio de este producto orgullosamente mexicano para favorecer su denominación de origen y comenzar a difundirlo como alimento funcional.

II. Introducción

De acuerdo a los momentos de globalización que hoy se viven se necesitan alternativas de organización como instrumentos de desarrollo rural. Este es el caso que se vive en la región de COTIJA que se encuentra al sur de la ciudad Cotija de la Paz, en las serranías limítrofes de los estados de Jalisco y Michoacán, abarcando los municipios de Cotija y de Tocumbo en Michoacán, así como el sur de Quitupan, Santa María del Oro en el norte y el este de Jilotlán en Jalisco, en la denominada Sierra de Jalmich.

Esta región se ha caracterizado por la elaboración del auténtico queso Cotija conocido por el nombre de la región donde se elabora y se comercializa, el cual se produce de forma artesanal con leche proveniente de vacas criollas, cruzadas con cebú y razas europeas que pastorean y ramonean libremente en los potreros serranos que reverdecen en la estación de lluvias de cada año en la región.

La leche entera y fresca que se emplea para la elaboración del queso es adicionada únicamente con cuajo y sal artesanalmente. La pasta así obtenida es depositada sobre dos mantas de henequén contenidas dentro de un aro metálico que le da forma cilíndrica y el tejido de la costra, proceso que da como resultado un queso aproximado de 20 Kg. como derivado de 200 litros de leche fresca.

Este queso genuino lleva un proceso de maduración durante los primeros tres meses en los ranchos de la región, lo que le confiere al queso características sensoriales tan singulares, como una corteza rugosa y gruesa, de color amarillo paja al ocre, textura firme, un sabor pronunciado y un aroma refinado.

La producción de queso Cotija es considerada como el sustento social y económico de muchas familias que viven de su producción: ganaderos, queseros y comerciantes. Y aunque hoy día el queso Cotija genuino producido en la sierra de Jalmich ostenta la Marca Colectiva “Cotija Región de origen” obtenida en el 2005 y se han obtenido muchos logros, tanto en el reconocimiento del queso Cotija como en el mejoramiento de la situación de los

productores y de la coordinación de los actores, aún no se ha logrado cumplir con la meta de conseguir la “Denominación de Origen”, la más adecuada para este tipo de producto, por el conflicto de interés creado por la existencia de un queso tipo Cotija muy difundido en todo México (Poméon, 2007).

Es por eso que proteger este producto con un nombre no es suficiente; eso debe ir de la mano con innovaciones técnicas que garantizan la calidad sin perder la tipicidad. Este proyecto de investigación pretende apoyar su desarrollo realizando un análisis del fenómeno de proteólisis y la influencia de la temperatura durante su proceso de maduración y de cómo al modificarse este factor ambiental en cada muestra analizada, se hace evidente la presencia de una flora microbiana distinta que repercute ocasionando la liberación de diferentes péptidos con posible actividad biológica que además exhiben una diferencia según la región de donde provenga el queso.

Así mismo y dado que la hipertensión arterial es el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares ((15-20 %) de la población adulta en el mundo, este trabajo se ha enfocado en la búsqueda específica de la presencia de péptidos antihipertensivos que podrían existir de forma natural en el queso Cotija genuino y poder dar pauta, para que otros científicos unan esfuerzos y colaboren para poder llegar a caracterizar este producto como alimento funcional.

III. Antecedentes

III.1. Leche

Es la secreción de la glándula mamaria de una o más vacas sanas después de diez días del parto y es el único alimento de los mamíferos recién nacidos, absolutamente indispensable para asegurar su supervivencia y después su crecimiento (Luquet, 1991; García Garibay y col., 1993). La leche es un líquido de composición compleja de color opaco blanco mate, más o menos amarillento según el contenido de β carotenos de la materia grasa. Tiene un olor poco marcado pero característico, de sabor ligeramente dulce y pH cercano a la neutralidad (Luquet, 1991; Alais, 1998).

III.1.2. Composición Química de la Leche

La composición química global de la leche varía según las especies animales, e incluso con las razas. Está compuesta por agua, carbohidratos, materia grasa, materia nitrogenada, materia no proteica, sales y vitaminas (Amiot, 1991).

Tabla1. Composición general de la leche de vaca (Scott, 1991; Riel 1993).

<i>Componentes Mayoritarios</i>	
	Composición Aproximada (%)
Carbohidratos	5
Sales minerales	0.9
Grasa	3.9
Proteínas	3.38
Agua	87
<i>Componentes minoritarios</i>	
Enzimas: lipasa, proteasa reductasa, lactoperoxidas, etc.	
Vitaminas:	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Liposolubles: D, E, K. ▪ Hidrosolubles: C y vit. del grupo B. 	
Pigmentos: carotenos, riboflavinas, xantatoxifila	
Células diversas: células epiteliales, bacterias, levaduras y hongos.	
Otros elementos: CO ₂ , O ₂ , N ₂ , etc.	
Sustancias extrañas.	

◆ **Carbohidratos**

El principal azúcar de la leche es la lactosa, que es un disacárido constituido por α o β glucosa unida a una β galactosa. La lactosa se encuentra en el queso entre 1% a 3% y es transformada en ácido láctico durante los primeros días de elaboración del queso y desaparece casi en su totalidad durante la maduración, ya que es fermentada por las bacterias acidolácticas (Dilanjan, 1984).

◆ **Sales**

Los minerales más abundantes presentes en la leche son calcio, potasio, magnesio y sodio. Los cuales se localizan en su mayoría en forma de sales solubles o formando compuestos con la caseína, ocupando solo el 1% de la composición total (Madrid, 1999).

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

◆ **Materia grasa**

Se encuentra en forma de emulsión de glóbulos grasos de uno a 8 micras de diámetro; la materia grasa está constituida por un 98.5% de triglicéridos (ésteres de ácidos grasos y glicerol), 1% de fosfolípidos y 0.5 % de sustancias liposolubles: colesterol, hidrocarburos y vitamina A, D, E y K (Amiot, 1991). Los lípidos aportan la mayor contribución directa e indirecta al desarrollo del sabor y aroma típico del queso, y pueden ser oxidados o hidrolizados (lipólisis) por enzimas de origen microbiano que transforman los ácidos grasos libres en compuestos de sabor como aldehídos, alcoholes y cetoácidos (Scott, 1991; Marilley y Casey, 2004).

◆ **Agua**

El valor nutricional de la leche como un todo es mayor que el valor individual de los nutrientes que la componen debido a su balance nutricional único. La cantidad de agua en la leche refleja ese balance. En todos los animales, el agua es el nutriente requerido en mayor

cantidad y la leche suministra una gran cantidad de agua, conteniendo aproximadamente 87% de la misma.

La cantidad de agua en la leche es regulada por la lactosa que se sintetiza en las células secretoras de la glándula mamaria. El agua que va en la leche es transportada a la glándula mamaria por la corriente circulatoria.

La producción de leche se afecta rápidamente por una disminución de agua y cae el mismo día que su suministro es limitado o no se encuentra disponible. Ésta es una de las razones por las que la vaca debe de tener libre acceso a una fuente de agua abundante todo el tiempo.

En la fabricación de queso el contenido de agua que queda retenido oscila entre 18 y 79%, la cual desempeña papeles importantes: es esencial para el desarrollo de los microorganismos, determina la velocidad de las fermentaciones y de la maduración, el tiempo de conservación del producto, la textura del queso y el rendimiento del proceso de elaboración (Madrid, 1999).

III.1.3. Proteínas de la Leche

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

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

III.1.3. 1. Caseínas

Las caseínas (fosfoproteínas) representan el 80% de las proteínas de la leche de vaca; el resto de las proteínas de la leche está constituido por β -lactoglobulina (alrededor del 10% de las proteínas totales), α -lactoalbúmina (en torno al 2% de las proteínas totales) y pequeñas cantidades de diversas proteínas (enzimas, inmunoglobulinas, etc.) solubles en el suero.

Las caseínas comparten una estructura similar, son proteínas conjugadas, la mayoría con grupos fosfatos, los cuales se encuentran esterificados a sus residuos de serina, estos grupos fosfatos son importantes para la formación de la micela de caseína. La conformación de las caseínas se parece mucho a las proteínas globulares desnaturalizadas. Tiene un gran número de residuos de prolina lo cual causa un torcimiento en la estructura y esto inhibe la formación de estructuras secundarias altamente ordenadas. Las caseínas tampoco contienen enlaces disulfuro, por lo que son muy estables a altas temperaturas y sus residuos hidrofóbicos presentan una considerable exposición (Cheftel, Cuq y Lorient, 1989).

Existen 4 caseínas, denominadas primarias las cuales son codificadas por genes independientes. Además, existe un grupo de componentes menores las cuales son péptidos derivados de las caseínas primarias y se denominan secundarias o derivadas, (Tabla 2).

Tabla 2. Caseínas primarias y su composición.

Caseínas primarias	Aminoácidos	Grupos fosfato	Conc. g/l	% Total Prot. en Leche	% De las caseínas	Caseínas Derivadas
α_s	199	8 o 9	12-15	33	42	α_{s0} , λ
α_s	207	13	3-4	9	11	α_{s3} , α_{s4} , α_{s6} , λ
β	209	5	9-11	25	31	γ_1 , γ_2 , γ_3
κ	169	1	3-4	9	11	

- *Caseína α_{s1}*

La caseína α_{s1} es la mayoritaria en la leche de vaca. La variante más común tiene 199 aminoácidos en su secuencia, con 8 ó 9 grupos fosfato. Desde el punto de vista estructural, está formada por tres regiones hidrofóbicas, con dos de ellas situadas en los extremos (aminoácidos 1-41, 90-113 y 132-199), y una zona muy polar (entre los aminoácidos 42 y 80), en la que se encuentran todos los grupos fosfato menos uno, lo que le da una carga neta negativa muy importante al pH de la leche (alrededor de 6,6). La caseína α_{s1} de vaca contiene 17 restos de prolina, distribuidos a lo largo de toda la cadena, lo que hace que tenga muy pocas zonas con estructura secundaria organizada. La asociación con otras moléculas de caseína se produce a través de interacciones hidrofóbicas en las que está implicada fundamentalmente la zona situada entre los aminoácidos 136 y 196 (Calvo, 1994). Es la más móvil de entre los componentes importantes de la caseína entera, y la más rica en fósforo; es también la más abundante. Su propiedad más señalada es la de ser insoluble en presencia de pequeñas cantidades de calcio ionizado, lo mismo a baja temperatura (hacia 0°) que a temperaturas medias (20 a 40°) (Luquet, 1991).

- *Caseína α_{s2}*

Esta caseína está formada por 207 aminoácidos, dos de los cuales son cisteínas. A causa de la variación del contenido en residuos fosfóricos su peso molecular varía entre 25 1250 a 25 390 Da. (Alais, 1998). Se conocen varias variantes genéticas (A,B,C y D) y también varias variantes en el grado de fosforilación. La máxima fosforilación afecta a 12 serinas y una treonina. Esta caseína tiene un puente disulfuro entre las cisteínas que ocupan las posiciones 36 y 40 de la secuencia, y es más hidrofílica que la caseína α_{s1} , con tres regiones de carga neta negativa, una de ellas en el extremo N-terminal. En la zona del extremo C-terminal se sitúan aminoácidos hidrofóbicos y con carga neta positiva (Luquet, 1991). Se considera como la caseína más sensible al calcio, sin embargo, la k le proporciona estabilidad como a las demás caseínas. (Alais, 1998).

- *Caseína β*

La caseína β es la caseína más hidrofóbica, y presenta además estructura particular, con una clara división en dos zonas. La que corresponde al extremo C-terminal es particularmente hidrofóbica, mientras que los aminoácidos más hidrofílicos, y todos los grupos fosfato unidos a serinas se concentran en el extremo N-terminal. La variante genética más común en la vaca está formada por 209 aminoácidos, con cinco grupos fosfato (Calvo, 1994). La caseína β no es sensible al calcio más que por a la temperatura ambiente, hacia 20°C y por encima de ésta (Alais, 1998).

- *Caseína κ*

La caseína κ tiene una estructura claramente distinta de la de las otras caseínas. En primer lugar, es algo más pequeña y está formada por 169 aminoácidos. Además está muy poco fosforilada, tiene solamente un grupo de fosfato. Esto hace que interaccione con el ión calcio mucho menos que las otras caseínas. Sin embargo, comparte con la caseína β la propiedad de tener zonas predominantemente hidrofílicas e hidrofóbicas bien marcadas y separadas (Calvo, 1994). Esta caseína es soluble en presencia de calcio a todas las temperaturas, por lo que posee un poder estabilizante sobre otras caseínas cuando se encuentran frente al calcio. Tiene el papel de “coloide protector”; permite la formación de micelas estables en presencia de calcio (Alais, 1998).

Una particularidad de esta caseína es la presencia de una zona con carga neta positiva entre los aminoácidos 20 y 115. Esta zona con carga neta positiva permite la interacción de la caseína con polisacáridos como el ácido siálico. También tiene en la cadena dos grupos de cisteína.

La k-caseína contiene un enlace Phe-Met muy lábil; constituye el sustrato específico de la quimosina (cuajo) en el curso de la primera fase de la coagulación que precede al cuajado de la leche. La ruptura específica de este enlace (105-106), da lugar a la formación de un péptido denominado “glicomacropéptido”, el cual tiene un carácter hidrofílico. La proteína residual,

insoluble, es llamada “para k-caseína”, y es más hidrófoba que la precedente. Por estas características la caseína k es una molécula típicamente “anfifílica” (Alais, 1998).

La ruptura de la caseína κ produce la desestabilización de la micela, y (a temperaturas por encima de 20° C) su agregación. Este proceso es el que se produce en la fabricación de la gran mayoría de los quesos (Calvo, 1994).

A pH 7 y 37°C, el agregado de iones Ca^{++} no afecta a la k-caseína, en cambio la β -caseína precipita y la α -caseína coagula. (Alais, 1998).

Durante el cuajado de la leche, el cuajo ataca a la caseína k y escinde el enlace peptídico fenilalanina-metionina. La paracaseína k así formada ya no estabiliza más a la micela de caseína, y en presencia de calcio, los conjuntos micelares coagulan, formando un gel, la cuajada expulsa al líquido llamado lactosuero por sinéresis (Luquet, 1991).

La velocidad de coagulación y sinéresis aumenta cuanto mayor sean los contenidos de caseínas, calcio y acidez de la leche.

III.1.3.2. Proteínas del Suero

Las proteínas del suero son una mezcla heterogénea de grupos de proteínas con diversas características, se insolubilizan por el calor antes de los 100 °C y se encuentran en muy pequeñas cantidades en leche; permanecen en el suero luego de la precipitación de las caseínas a pH 4.6 durante el proceso de elaboración del queso. Se encuentran de 5 a 7g por cada litro de leche, las principales son: β -lactoglobulina (2-4g/L), α -lactoalbúmina (0.6-1.7 g/L), albúmina bovina del suero (0.2-0.4g/L) e inmunoglobulinas (0.5-1.8 g/L) (Vega y León y col., 2003).

Las proteínas del lactosuero pueden ser de síntesis mamaria, como la α -lactalbúmina y la β -lactoglobulina que representan conjuntamente el 70% de las proteínas del lactosuero de vaca, o bien de transferencia sanguínea, como la albúmina y las inmunoglobulinas. Las propiedades funcionales del lactosuero vienen dadas por las de sus dos principales proteínas, α -

lactalbúmina y β -lactoglobulina. Entre ellas destacan su solubilidad, incluso a pH 4,5, si no se calientan, sus propiedades emulsionantes y espumantes y su capacidad de gelificación. Se recuperan por ultrafiltración o intercambio iónico, con secado a temperaturas lo más bajas posible para evitar su desnaturalización (Alais, 1998).

III.2. Queso

El queso puede definirse como un alimento lácteo obtenido por la coagulación de la leche con la subsecuente separación del suero. Esta definición cubre la mayoría de los quesos producidos en el mundo; sin embargo, algunos como el queso cotagge y el queso crema u otros que se obtienen del suero como el ricotta, y el requesón, que no se producen por la coagulación enzimática sino por precipitación ácida, constituirán excepciones a esta definición (García, Quintero y López; 1993).

La FAO define al queso como un producto fresco o madurado, que se obtiene por el drenado posterior a la coagulación de la leche, crema, leche parcial o totalmente descremada o combinaciones de esta, no obstante esta definición excluye a los quesos obtenidos del suero (Scott;1986).

La producción de quesos se inicia con las diferentes operaciones que permiten, como primer paso, la formación de un coágulo o cuajada de composición fisicoquímica determinada en cuanto extracto seco, contenido en materia grasa y minerales, (acidez, pH y textura). Posteriormente estas propiedades del coágulo, bajo condiciones adecuadas de maduración (salado, temperatura, humedad, aireación), favorecen el desarrollo de microorganismos naturales o inoculados y la acción de sus enzimas. Esta actividad biológica, ligada a la de las enzimas naturales de la leche y las coagulantes, provocan la transformación de un coágulo de leche con poco sabor y aroma en productos organolépticamente mucho más atractivos.

La coagulación es esencialmente la formación de un gel desestabilizado de las micelas de la caseína formando un agregado y formando una red que parcialmente inmoviliza el agua y atrapa los glóbulos grasos en la matriz recientemente formada. Existen agentes que se utilizan para provocar la desestabilización de las micelas y formación de un coágulo: los ácidos y ciertas enzimas proteolíticas.

La acidificación de la leche causa la desestabilización de las micelas por la disminución en las cargas de los grupos ácidos de las caseínas, esto reduce el potencial en la carga superficial y el nivel de hidratación y aumenta la solubilización de sales hacia la fase acuosa. En la cercanía del pH isoelectrónico (pH 4.6) se forma una red proteica insoluble constituida por uniones intermoleculares de tipo electrostático e hidrofóbico. La acidificación puede ser provocada por bacterias lácticas o por adición de ácidos. Además del pH, la coagulación depende de la temperatura y el contenido de sales (principalmente calcio).

La coagulación de la leche puede ser llevada a cabo por enzimas proteolíticas de muy variado origen: bacterianas, fúngicas, vegetales o animales. El cuajo de ternera (extracción de enzimas del abomaso) es el agente coagulante usado tradicionalmente constituido principalmente por la proteasa ácida quimosina y en menor proporción por la pepsina.

La quimosina es la mejor opción para la elaboración de quesos, ya que debido a su alta especificidad permite obtener quesos con adecuada textura, buen sabor y altos rendimientos (Scott, 1979; Cheeseman, 1981; Green, 1984). Por otra parte, debido a la creciente demanda de quesos en el mundo y la tendencia a la baja de la carne de ternera, existe un gran déficit de cuajo de este bovino, lo que ha obligado a buscar otras alternativas en distintas fuentes de proteasas animales y microbianas. Una estrategia para subsanar la carencia de quimosina en el mercado internacional es recuperar selectivamente la quimosina o producirla con microorganismos recombinantes (García y López, 1984).

III.2.1 Proceso de Maduración

Las características bioquímicas del queso cambian durante la maduración como consecuencia del desarrollo microbiano y de sus actividades enzimáticas, permitiendo así que el queso adquiera su típico sabor y textura. Los microorganismos presentes en el queso catabolizan el lactato, produciendo acetato, piruvato y CO₂ e hidrolizan las proteínas, péptidos y grasas a compuestos más pequeños (Demarigny y col., 1997). Esta actividad se considera esencial para las características típicas del queso y puede ser comprendida mejor evaluando los tres principales comportamientos del proceso madurativo: glicólisis (lactosa), proteólisis (proteínas) y lipólisis (materia grasa) (Scott, 1991; Alais, 1998).

III.2.2. Glicólisis

La glicólisis es la obtención de ácido láctico como consecuencia de la fermentación de la lactosa por los cultivos iniciadores que permanecen en la fase acuosa del “coágulo o cuajada”, que realizan una fermentación láctica modificando las condiciones del medio para que tengan lugar reacciones enzimáticas y no enzimáticas.

Básicamente el catabolismo de los carbohidratos se distingue por dos tipos de fermentación, la primaria y la secundaria. El primer tipo se lleva a cabo en la tina de cuajado durante las primeras 24 horas y es cuando se metaboliza la lactosa a ácido láctico. Este compuesto es hidrolizado por los cultivos iniciadores, como Lactococos, produciendo glucosa y galactosa. La glucosa se oxida a piruvato por la ruta de Embden-Meyerhof o glicólisis y a su vez produce compuestos de sabor como el diacetilo, acetoína, acetaldehído y etanol (Marilley y Casey, 2004; Tarvaria y col., 2005).

La fermentación secundaria se desarrolla a partir del citrato residual el cual se convierte en componentes aromáticos como el diacetilo, acetoína y acetolactato, así como CO₂. Por otra parte la β-galactosidasa es convertida por las bacterias galactosa positiva y Leuconostoc, a través

del ciclo de Leloir a glucosa-6-fosfato y por *Lactococos* a través de la ruta de tagatosa a gliceraldehído-3-fosfato (Marilley y Casey, 2004).

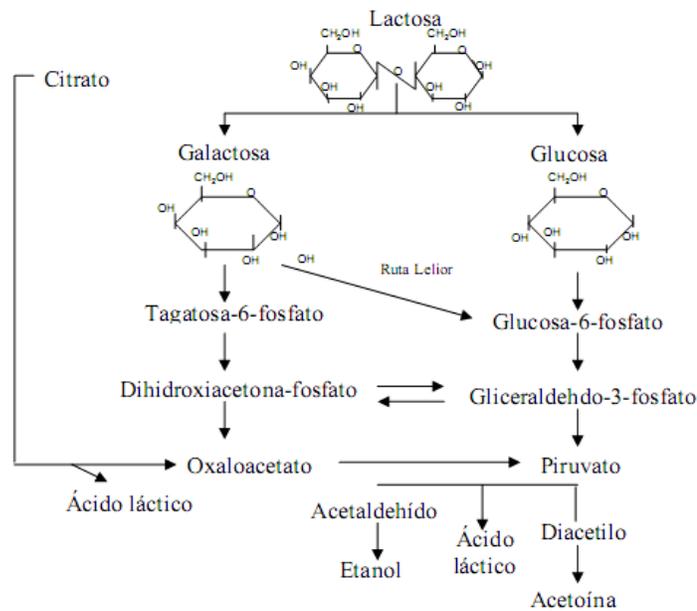


Figura 1. Metabolismo de los Carbohidratos.
(fuente: Marilley y Casey, 2004).

Los microorganismos son un componente esencial en esta etapa de transformación bioquímica. Ellos pueden ser divididos en dos grandes grupos: los iniciadores (bacterias ácido lácticas) y la microbiota secundaria (microorganismos que actúan posteriormente a la etapa de cuajado y que pueden ser, o no, adicionados intencionalmente).

Los microorganismos iniciadores, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus delbrueckii* son utilizados individualmente o combinados, dependiendo de la variedad o tipo de queso, para la producción de ácido durante la manufactura y contribuyen en el proceso de maduración. Los microorganismos secundarios no contribuyen en la producción de ácido, pero generalmente cumplen un rol importante durante la maduración en la formación de compuestos de olor, sabor y color, entre otros. Esta microbiota secundaria está compuesta por mezclas complejas de bacterias ácido lácticas no iniciadoras, levaduras y hongos que crecen interna o externamente en el queso y son diferentes según el tipo de producto (García, 2006).

Así mismo existen dos rutas principales para la fermentación de azúcares. La primera es la glicólisis (Embden-Meyerhof) o fermentación homofermentativa, donde el ácido láctico resulta ser el 90% del producto involucrándose principalmente bacterias de los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus* (Martín Del Campo, 2006).

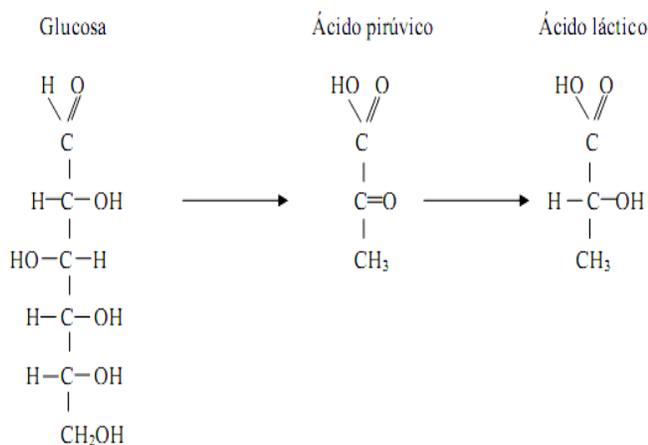


Figura 2. Metabolismo homofermentativo de los azúcares.
(fuente : Raisman y González, 2005).

El segundo tipo fermentación es la heterofermentativa, ruta de 6-fosfogluconato/fosfocetolasa o de Warburg-Dickens (WD), donde se ve involucrado principalmente el género *Leuconostoc* lo que da como resultado cantidades significativas de etanol, CO_2 y ácido láctico (Axelsson, 1998).

Por su parte el propionato de calcio formado en los quesos de pasta cocida y de “ojos” (tipo Gruyère) les da un sabor suave y junto con la prolina (que se libera como resultado de la proteólisis), se le considera como un importante elemento del aroma (Alais, 1998).

III.2.3. Proteólisis

La proteólisis es el más complejo y, en muchas variedades de queso, el más importante de los tres eventos primarios (glicólisis, lipólisis y proteólisis) que ocurren durante el madurado del queso (Fox y col., 1993). Es el proceso mediante el cual la caseína, proteína mayoritaria de la leche, se hidroliza a compuestos de menor peso molecular como péptidos y aminoácidos libres.

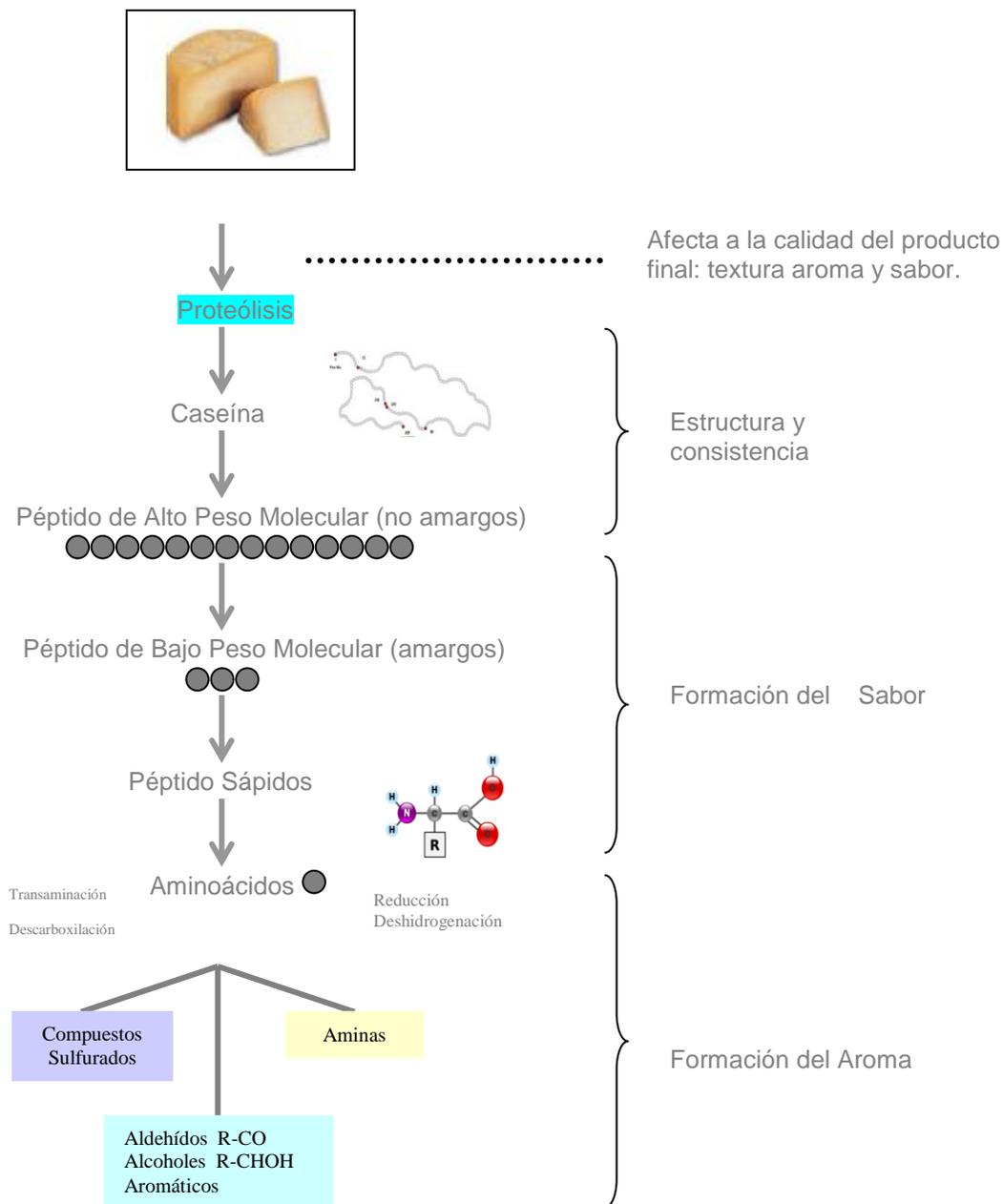


Figura 4. Metabolismo de las proteínas.
(Fuente: Marilley y Casey, 2004).

Según Saldo (2002), diferentes agentes proteolíticos intervienen en la degradación de la caseína dentro de las cuales destacan:

- ◆ Cuajos de origen animal, vegetal y microbiano, que además de participar en el proceso de coagulación por hidrólisis de la κ -caseína son responsables de la hidrólisis inicial de la caseína, principalmente de la α_{S1} -caseína, durante la maduración del queso.
- ◆ Las enzimas proteolíticas endógenas de la leche, constituidas mayoritariamente por la plasmina y catepsina.
- ◆ Proteasas microbianas presentes en la leche cruda que proceden principalmente de las bacterias psicrótrofas. Estos microorganismos, fundamentalmente del género *Pseudomonas*, sintetizan proteasas termorresistentes que pueden dar lugar a efectos adversos durante la elaboración y maduración del queso. La mayoría de proteasas de psicrótrofos tienen actividad coagulante sobre la leche, son capaces de degradar κ - α_{S1} y β - caseínas y tienen una variable actividad en proteínas séricas no desnaturalizadas.
- ◆ Las enzimas de bacterias lácticas procedentes del cultivo iniciador: Los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y la especie *Streptococcus thermophilus*, empleados como cultivos iniciadores en la elaboración del queso, poseen un sistema proteolítico que actúan fundamentalmente hidrolizando la caseína y los polipéptidos originados por el cuajo a péptidos más pequeños y aminoácidos.
- ◆ Las enzimas de bacterias lácticas que no forman parte del cultivo iniciador (NSLAB, según sus siglas en inglés), entre las que destacan los lactobacilos heterofermentativos facultativos que constituyen la población microbiana mayoritaria al final de la maduración de muchos quesos. En algunos tipos de quesos también es de destacar la presencia de enterococos, microorganismos, que poseen un sistema proteolítico muy activo.
- ◆ Otras enzimas microbianas procedentes de la microbiota secundaria y de contaminación. Los micrococos poseen un sistema proteolítico muy importante, que participa en la degradación de la α_{S1} y β - caseínas. Por otra parte, las proteínas y peptidasas de microorganismos como *Penicillium spp.*, *Geotrichum candidum* y

Brevibacterium linens juegan un papel importante en la proteólisis de quesos madurados por mohos.

Los fenómenos proteolíticos pueden dividirse en proteólisis primaria y secundaria. La proteólisis primaria corresponde a la hidrólisis de caseínas, liberando péptidos de distinto tamaño. Se produce como resultado de la acción del cuajo (quimosina y pepsina), de las proteasas nativas de la leche (plasmina) y en menor medida de las proteasas de las bacterias lácticas del fermento (Saldo, 2002).

La proteólisis secundaria convierte éstos en aminoácidos libres, y éstos sirven de sustrato para la producción de otras sustancias sápidas como aminos, tioles y tioésteres. Los microorganismos del queso son los principales responsables de la proteólisis secundaria, tanto bacterias lácticas como mohos y levaduras. Algunas otras bacterias pueden tener un efecto importante en algunos quesos (Saldo, 2002).

El proceso proteolítico influye en la textura debido a la ruptura de la malla proteica, al incremento del pH por formación de NH_3 y en la mayor capacidad de retener agua por los grupos amino y carboxilo formados. La formación de péptidos de pequeño tamaño molecular y aminoácidos influye directamente en el sabor básico del queso. Además, los aminoácidos son precursores de otros compuestos responsables del aroma (ver figura 4).

En la proteólisis también se originan compuestos responsables de características organolépticas no deseadas, como péptidos amargos, cuyo nivel en determinadas ocasiones pueden superar el umbral de percepción sensorial del amargor. Las enzimas proteolíticas desempeñan un papel especial en la formación de sabores amargos. En contra de opiniones previas, que relacionaban el sabor amargo con aminoácidos específicos o con la longitud de la cadena peptídica, Ney (1979) fue el primero en relacionar el amargor de los productos lácteos con la hidrofobicidad promedio de los péptidos. Encontró que los péptidos de 100-600 Da con una hidrofobicidad promedio de más de 1400 cal/mol daban lugar a sabores amargos. Posteriores trabajos indican que la presencia de un aminoácido básico (como la arginina) en el

extremo N-terminal o la presencia de un aminoácido hidrofóbico en el extremo C-terminal aumentaría el amargor (Saldo, 2002).

De acuerdo a García Garibay y colaboradores (1993) los péptidos de sabor amargo son producidos por la quimosina, las proteasas de la pared de las bacterias lácticas y, en su caso, por proteasas extracelulares de hongos. Bajo condiciones normales, estos péptidos amargos son hidrolizados por peptidasas de la flora láctica y secundaria. El defecto ocurre cuando la proteólisis primaria es rápida y la hidrólisis lenta y está relacionado al tipo de enzima coagulante utilizada, su cantidad residual, a la selección de la flora láctica, al desarrollo de esta flora y la de la secundaria y las condiciones de maduración. Es así como la intensidad de la proteólisis durante la maduración del queso dependerá de la naturaleza y concentración de las enzimas presentes y de varios factores que modifican su actividad tales como pH, temperatura, concentraciones de sales y potencial redox. Para medir su intensidad se realizan determinaciones de las distintas fracciones nitrogenadas como los péptidos, los aminoácidos libres y el nitrógeno amoniacal, haciendo uso de técnicas como la precipitación fraccionada ó electroforesis.

III.2.4. Lipólisis

La lipólisis es la reacción en la que las lipasas hidrolizan el éster entre los ácidos grasos y el glicerol. Ésta se desarrolla generalmente en el orden triglicéridos > diglicéridos > monoglicéridos (García Garibay y col., 1993). Algunos de estos compuestos son volátiles y contribuyen en gran medida al aroma del queso. Además, son precursores de otros compuestos involucrados en el aroma como alcoholes, ésteres etílicos, aldehídos y metilcetonas (McSweeney y Sousa, 2000).

Las lipasas que podrían actuar en el queso tienen diferentes orígenes: la leche, la preparación enzimática coagulante, los cultivos, los adjuntos del cultivo, las bacterias iniciales presentes en el queso y en el caso de que sean usadas, las lipasas exógenas (McSweeney y Sousa, 2000). Casi todos los microorganismos son capaces de secretar lipasas, pero lo hacen de forma muy distinta según las especies. Los mohos producen grandes cantidades de lipasas y por esta

razón, los quesos de pasta azul y los quesos blandos madurados por mohos sufren una lipólisis más intensa. En general, las bacterias lácticas son poco lipolíticas, aunque a largo plazo producen un cierto grado de lipólisis en los quesos de flora esencialmente láctica como el Cheddar (Amiot, 1991).

Los productos de la degradación de la materia grasa tienen gran influencia en el aroma. Son suficientes pequeñas cantidades de cada uno de los ácidos butírico (C_4), caproico (C_6), caprílico (C_8) y cáprico (C_{10}) para dar al queso un sabor pronunciado. El sabor picante del Roquefort se debe, por una parte, a los ácidos grasos volátiles (de C_4 a C_{10}) y por otra, a las metilcetonas (Alais, 1998).

Los ácidos grasos liberados también sufren transformaciones por oxidación y al producirse una lipólisis excesiva puede causar problemas de rancidez, como en el caso particular del ácido butírico que ocasiona cambios desagradables del aroma y sabores rancios como a jabón.

No obstante, la actividad lipolítica detectada en el queso está influenciada además por muchos otros factores, como la calidad de la leche, los tratamientos tecnológicos aplicados a ésta (homogeneización, agitación, enfriamientos, bombeo, etc.) y por las condiciones de maduración de los quesos (Walstra y Jenness, 1984).

III.3. Actividades Biológicas de los Péptidos Bioactivos Lácteos

No existe duda alguna de que hay que considerar a la leche y derivados dentro de la categoría de alimentos funcionales ya que, particularmente las proteínas y sus derivados, tienen probadas funciones fisiológicas más allá de la nutrición (Jiménez y García, 2006).

En los últimos años el interés por el estudio y el desarrollo de alimentos funcionales y nutracéuticos ha experimentado un gran incremento, tanto por su evidente valor terapéutico como por su gran interés para la industria alimentaria, dada la gran repercusión económica que supone la comercialización de este tipo de alimentos y de los productos que los contengan. Los “alimentos funcionales” se definen como aquellos alimentos y componentes alimentarios que, tomados como parte de la dieta, proporcionan beneficios más allá de sus valores nutricionales tradicionales, bien sea mejorando una función del organismo o reduciendo el riesgo de enfermedad, en tanto que los nutracéuticos incluye a nutrimentos y otras sustancias que se encuentran en alimentos adicionados, suplementos alimenticios y en plantas medicinales (Martínez, 2006; Vega y León y col., 2003).

Los péptidos bioactivos se incluyen en el grupo de ingredientes funcionales de naturaleza proteica, que permiten la obtención de alimentos funcionales. Estos péptidos se definen como secuencias de aminoácidos inactivas en el interior de la proteína precursora, pero que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación mediante hidrólisis química o enzimática. Generalmente, son péptidos de pequeño tamaño, de 3 a 20 aminoácidos, liberados durante el procesado industrial de los alimentos o bien, durante la digestión gastrointestinal (Meisel y col., 1989).

La liberación de los péptidos bioactivos a partir de una secuencia proteica puede producirse bien por hidrólisis enzimática (Abubakar y col., 1998; Philanto-Leppälä y col., 2000), por procesos fermentativos (Yamamoto, Maeno y Takano, 1999; Gobbetti y col, 2000) o bien por la combinación de ambos procesos, que tiene lugar ya sea bien durante el procesado de alimentos o bien durante la digestión gastrointestinal (Philanto-Leppälä, Rokka y Korhonen,

1998). El empleo de microorganismos modificados genéticamente que expresan la secuencia peptídica bioactiva abrió un nuevo campo en la obtención de péptidos con actividades biológicas (Kim y col., 1999). Las actividades descritas hasta la actualidad para estos péptidos son diversas e incluyen la actividad antihipertensiva, quelante de minerales, opiácea, inmunomodulante, antimicrobiana y antitrombótica, entre otras.

III.3.1. Actividad antihipertensiva (péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA))

Los péptidos antihipertensivos inhiben la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (peptidildipeptido hidrolasa), que es una enzima multifuncional presente en diferentes tejidos (plasma, pulmón, riñón, corazón, músculo esquelético, páncreas, cerebro) y actúa en el sistema renina-angiotensina, hidrolizando la angiotensina-I, decapeptido inactivo, producido por la acción de la renina. La hidrólisis conduce a la liberación de la angiotensina-II y el dipéptido C-terminal Hys-Leu. La angiotensina-II es un compuesto de elevada potencia vasoconstrictora; su acción provoca la contracción rápida de las arteriolas y por tanto, el incremento de la presión arterial. Además, estimula la secreción de aldosterona por las glándulas suprarrenales, hormona que induce la retención de sodio y agua y la excreción de potasio. La acumulación de agua provoca el incremento del volumen extracelular, el consecuente aumento de la presión arterial y la neutralización de la producción de renina. La ECA actúa simultáneamente en el sistema bradiquinina-caliceína, catalizando la degradación de las bradiquininas, compuestos de potente acción vasodilatadora; esta acción favorece al mismo tiempo el incremento de la presión arterial (Ver Figura 5) (Hernández, (2002).

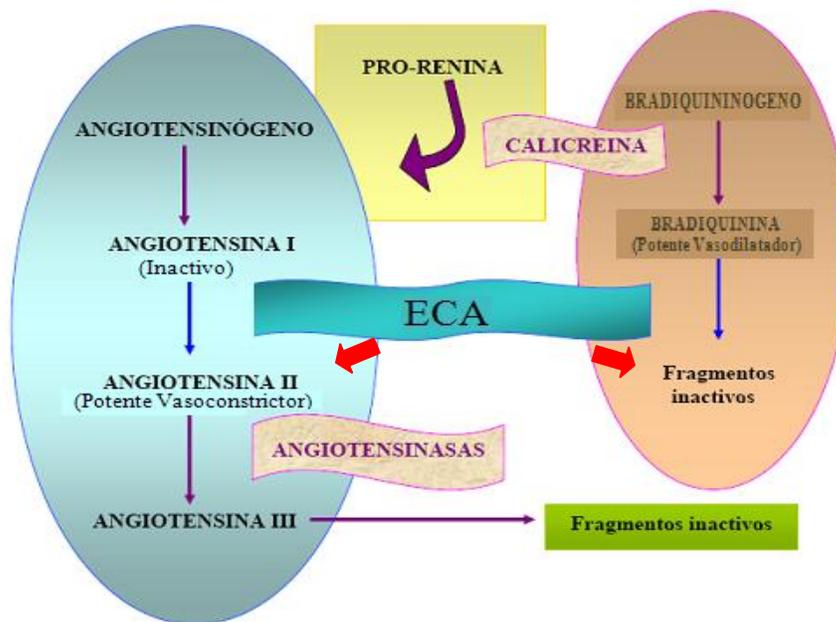


Figura 5. Sistema renina-angiotensina y bradiquinina-caliceína. Acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), (Fuente : Hernández, 2002).

Los inhibidores de ECA derivados de proteínas de leche representan diferentes fragmentos de caseínas, llamados casoquininas o proteínas del suero llamadas lactoquininas. Las casoquininas más activas son de fragmentos de α_{s1} -CN (f 23-27) y β -CN (f177-183) y tienen un IC_{50} de $20\mu\text{m/L}$ (IC_{50} =concentración de péptido que inhibe la actividad de ECA en un 50%). La β -casamorfina-7 (un opioide) tiene actividad inhibitoria de ECA; otros péptidos han sido relacionados con actividad inhibitoria de ECA moderada (β -lactorfina). Un fragmento de β -lactoglobulina (f142-148) es un péptido inhibitorio de ECA muy potente (IC_{50} = $42.620\mu\text{m/L}$) además de haber mostrado tener relativa resistencia a la digestión (González, 2004).

Aunque la relación actividad-estructura de los péptidos inhibidores de ECA aún no ha sido establecida, estos péptidos muestran algunas características comunes. La ECA parece tener preferencia por sustratos o inhibidores competitivos con residuos hidrofóbicos (aromáticos o cadenas ramificada) en cada una de las tres posiciones C-terminal. Muchos de los péptidos inhibidores contienen prolina en la posición C-terminal. Las casoquininas también contienen lisina o arginina en el residuo C-terminal. La información sobre actividad-estructura sugiere que la carga positiva del grupo guanidino o del grupo e-amino de la posición C-terminal de arginina

o lisina, respectivamente, contribuyen al potencial inhibitorio (Meisel, 1997). Y aunque las investigaciones realizadas sobre péptidos bioactivos antihipertensivos en productos lácteos y derivados indican que, aunque el mecanismo fisiológico de estos péptidos aún no está del todo resuelto, estos péptidos ejercen una inhibición principalmente competitiva de la ECA.

De hecho, hoy día dentro del grupo de los péptidos bioactivos, aquéllos con actividad antihipertensiva han centrado el interés de los científicos y las industrias debido al incremento de la mortalidad en los países industrializados por la hipertensión y/o por sus complicaciones renales, cardíacas o cerebrales. Ya han comenzado a comercializarse algunos alimentos con propiedades antihipertensivas. En Japón por orden legislativa se coloca una leyenda en la etiqueta de los alimentos con funciones adicionales a las nutritivas, que dice FOSHU o “Food for Special Health Uses”. Se ha demostrado su acción preventiva de la hipertensión y de los trastornos del sistema circulatorio (Sugai, 1998). Además, con esta misma actividad han comenzado a comercializarse distintos productos lácteos fermentados. En Japón, la leche fermentada Calpis (Takano, 1998), elaborada con *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae* que contiene el dodecapéptido f(23-34) derivado de la α 1-CN y que posee propiedades antihipertensivas se comercializa ya con esta etiqueta. En Finlandia, la leche fermentada Evolus (Leporanta, 2001), elaborada con *Lactobacillus helveticus*, aseguran que reduce la presión sanguínea en pacientes hipertensos tras la acción inhibitoria de la ECA de los tri-péptidos Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro. Estas leches fermentadas ya se comercializan como alimentos funcionales preventivos de la hipertensión en sus países de origen.

III.3.2. Actividad quelante de minerales.

Los caseínofosfopéptidos (CPPs) son fragmentos derivados de la α 1-CN, α 2-CN y β -CN que poseen un potencial funcional y nutracéutico, debido principalmente a su capacidad de ligar y solubilizar minerales, tales como calcio, zinc, hierro, magnesio, etc.

La mayoría de estos péptidos contienen una secuencia con tres grupos de fosfoserina seguida de dos glutámicos. Las cadenas laterales negativas, en particular las de los grupos fosfato

son las responsables de la unión de los minerales, especialmente del calcio (Sato y col., 1986). Además, las secuencias próximas a los grupos fosforilados determinan las diferencias en la actividad quelante del calcio de los distintos caseínofosfopeptidos (Schlimme y Meisel, 1995).

Estos péptidos ejercen efectos en la absorción del calcio y de otros elementos traza en el intestino, además de inhibir la caries mediante la recalificación dental; de hecho actualmente son empleados en chicles con el nombre comercial Recaldent™, los cuales al contener caseínofosfopeptidos (CCP) y fosfato en forma de fosfato de calcio en un estado amorfo no cristalino (ACP) son insolubles; es decir forman una estructura cristalina en el pH neutro que favorece el desarrollo del esmalte y al proceso de remineralización en los dientes (Hernández, 2002).

III.3.3. Actividad opiácea

Los péptidos opioides son polipéptidos pertenecientes al grupo de los compuestos neuropéptidos. Al igual que otros agentes afines, éstos presentan propiedades neuromoduladoras (Torres, Vallejo y González, 2005).

Los péptidos opioides típicos son conocidos como endógenos y son derivados de encefalinas, endorfinas y dinorfinas. Estos actúan como receptores de opioides. Los efectos fisiológicos que pueden ejercer estos péptidos dependen del tipo de receptor al que se una: los receptores μ están vinculados al control de la motilidad intestinal y del comportamiento emocional, los receptores δ al control del comportamiento emocional y finalmente los del tipo κ están relacionados con la analgesia y la saciedad (Korhonen & Philanto, 2003). Los péptidos opioides atípicos derivados de las proteínas de la leche pueden presentar actividad agonista y actúan principalmente como activadores del receptor μ que está vinculado al control de la motilidad intestinal; otros péptidos opioides pueden tener actividad antagonista, pues bloquean a los receptores μ y disminuyen el movimiento intestinal; además, se unen a receptores κ y provocan un efecto analgésico y de sensación de saciedad.

Los péptidos opioides derivados de la CN, son conocidos como casomorfina y/o casoxinas, mientras que los derivados de las proteínas séricas, son conocidos como lactorfina. Los péptidos opioides atípicos tienen secuencias N-terminales que difieren de los péptidos opioides endógenos típicos. La característica estructural común entre péptidos opioides endógenos y exógenos, es la presencia de un residuo de tirosina en el amino terminal (excepto opioides derivados de α_{s1} -CN) y la presencia de otro residuo aromático (fenilalanina o tirosina), en la tercera o cuarta posición.

Se ha descrito la existencia en la leche de péptidos con actividad antagonista opioide como: β -casomorfina, α -caseína exorfina, casoxina, β -casorfina, α -lactorfina, β -lactorfina y lactoferroxina, que según parece podrían antagonizar el efecto de inhibición de la motilidad gástrica producida por las casomorfina.

Otro péptido con acción sobre el sistema gastrointestinal es el glicomacropéptido también conocido como caseinomacropéptido o caseinoglicopéptido, que es un glicopéptido presente en el suero que es liberado por la κ -caseína después de la hidrólisis con el cuajo; y al cual se le han atribuido efectos benéficos como la reducción significativa de la secreción gástrica, ayudando con esto a la prevención de diferentes tipos de diarreas (Baró y col, 2001).

III.3.4. Actividad inmunomodulante

Los sistemas implicados en la defensa del organismo frente a agentes patógenos son bastante complejos y actualmente se sabe que la leche materna transfiere al neonato inmunidad activa gracias a las inmunoglobulinas e inmunidad pasiva debido a factores antimicrobianos presentes en el suero lácteo.

En concreto los péptidos que ejercen esta actividad son fragmentos derivados principalmente de la α_{s1} -CN, de la β -CN, de la κ -CN y de la α -La. Este tipo de péptidos estimulan la actividad fagocítica en los fagocitos (células capaces de destruir bacterias o agentes

nocivos para el organismo) y también modulan las funciones de los linfocitos (Schlimme y Meisel, 1995).

II.3.5. Actividad antimicrobiana

Se han identificado péptidos con actividad antimicrobiana derivados de las proteínas de suero lácteo, lactoferrina, α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, y derivados de la fracción caseínica, principalmente α_{S1} , α_{S2} y κ -caseína. Los péptidos descritos, su origen y los métodos de obtención propuestos han sido recogidos recientemente en varias revisiones sobre el tema. La actividad de estos fragmentos ha sido demostrada casi exclusivamente mediante ensayos de actividad antimicrobiana *in vitro*. Solamente para el fragmento 1-23 de la α_{S1} -caseína (isracidina) y para la lactoferrina se han llevado a cabo ensayos en animales de experimentación, demostrándose, en ambos, una acción inmunoestimulante y protectora frente a infecciones recurrentes. Por lo tanto este grupo de péptidos tienen un enorme potencial para su uso en alimentos o preparaciones farmacéuticas, e incluso, se ha sugerido que podrían tener implicaciones fisiológicas al formarse *in vivo* durante la digestión de las proteínas lácteas (Gobbetti, Minervini y Rizzello, 2004).

III.3.6. Actividad antitrombótica

Determinados fragmentos derivados de las proteínas lácteas han demostrado ejercer una acción antitrombótica. Estos péptidos actúan mediante diferentes mecanismos; por ejemplo, algunos péptidos derivados de la κ -caseína presentan cierta homología con una región de la cadena γ del fibrinógeno humano y compiten con éste por los receptores plaquetarios, inhibiendo así la agregación de las plaquetas. La actividad antitrombótica del glicomacropéptido y otros fragmentos derivados de la κ -caseína y de la molécula de lactoferrina de distintas especies se ha demostrado *in vitro* mediante la utilización del plasma humano o animal enriquecido en plaquetas. Estos estudios en recién nacidos alimentados tanto con leche materna como con fórmulas maternizadas han revelado la presencia de péptidos con actividad antitrombótica en plasma en concentración suficiente como para ejercer actividad. En adultos se ha detectado

caseinomacropéptido tras la ingesta de leche o yogur en estómago, duodeno y plasma, lo que pone de manifiesto que péptidos de tamaño grande pueden atravesar la barrera intestinal en adultos. En ratas también se ha detectado caseinomacropéptido tras su administración oral, pero el mecanismo para atravesar la barrera intestinal y sus implicaciones biológicas todavía deben ser esclarecidas (Fiat y col, 1993).

III.4. Historia de la Sierra de Jalisco y del Auténtico Queso Cotija

Desde finales del siglo XVI, los españoles, criollos y mestizos que se fueron “arranchando” en el valle de Cotija y posteriormente en las serranías de sus alrededores en busca de oro y espacio libre para sus reses, sentaron las bases para que muy pronto Cotija se convirtiera en el centro rector de una extensa y accidentada región ganadera, misma que llegó a abarcar todo el extremo occidental de lo que hoy es el estado de Michoacán y su aledaño y antiguo corregimiento de Jilotlán, situado en el estado de Jalisco. El producto ganó el nombre actual de “queso Cotija” tanto por el origen de las primeras manos que lo fabricaron en la zona, como por ser de este lugar los principales arrieros¹ y comerciantes que a partir del siglo XVIII lo distribuyeron a distintos y lejanos lugares del país. En la primera mitad del siglo XX alcanza su auge, pues según los ancianos, “se vivía muy bien” del queso Cotija en aquella época. Pero el desarrollo de las infraestructuras públicas, carreteras y electricidad en particular, fueron llevando a la decadencia progresiva del queso Cotija. La producción pasa de ser estacional a anual, con la introducción de razas mejoradas criadas de manera semi-intensiva. El queso sólo se conserva unos días hasta su venta, ya no se madura. Además, la llegada de la electricidad incentiva la introducción de innovaciones técnicas, como el uso de descremadora provocaron la evolución de pueblos aledaños a la actual zona de producción delimitada como región de origen. Poblados que pasaron de la producción artesanal de queso Cotija, madurado, a una producción industrial de quesos, primero con leche bronca y luego quesos rellenos y análogos².

¹ Los arrieros eran personas dedicadas al negocio de productos que transportaban de una zona a otra del país generalmente con mulas. Salían de la zona de Cotija hacia el centro y el sur del país, aun hasta Guatemala.

² Se habla de quesos rellenos cuando se descrema totalmente la leche para sustituirla por grasa vegetal. Los quesos análogos son aquellos que se elaboran sin leche fluida, usando productos como la leche en polvo, caseinas, grasa vegetal, etc.

Es claro que frente a la producción de quesos de forma semi-industrial o industrial, los productores artesanales no pudieron competir, así que se especializaron unos en la producción de leche y otros se volvieron queseros “de tiempo completo”. Pero la tradición del queso Cotija, como producto estacional, artesanal y madurado, se mantuvo en las zonas más aisladas de la región, donde no hubo beneficio del mejoramiento de las infraestructuras. De ahí que se mencione a la Sierra de Jalmich como la zona de refugio del auténtico queso Cotija.

La razón de esa continuidad es muy sencilla: los rancheros, si quieren permanecer en sus ranchos, no tienen otra alternativa que seguir con el sistema de producción tradicional que vincula la producción de queso Cotija, la crianza de becerros y el cultivo itinerante del maíz (Poméon, 2007).

Es así como este producto sobrevivió hasta nuestros días pero sin duda, hoy día una de las principales problemáticas que han frenado su buen posicionamiento es la gran comercialización y auge de imitaciones de queso “tipo Cotija” que aunque distan mucho del queso genuino y original, llevan por mucho una gran ventaja al ser comercializados en supermercados en porciones empacadas que están más al alcance del consumidor (Poméon, 2007). (Ver figura 6).



Figura 6: de la izquierda a la derecha: un queso tipo Cotija (artesanal), un queso Cotija, y un queso tipo Cotija (industrial) (Fuente: Poméon, 2007).

Sin embargo, a pesar de que la mayor demanda de quesos mundial es del tipo «quesos industriales o estandarizados», el consumo de quesos con métodos de producción tradicionales tiene amplia aceptación en el mundo, aunque muchas veces son más caros y tienen menor

volumen de producción, generando situaciones desventajosas ante la gran distribución moderna.

En este sentido, las estrategias de emprendimientos locales exigen acciones colectivas en el territorio por parte de empresas locales, lo cual genera posibilidades de desarrollo competitivo diferentes a las pautadas por grandes empresas. El territorio se vuelve así un atributo de calidad y reputación de los productos que va más allá de la mera ubicación geográfica. Estudios realizados en Francia demuestran la importancia de este tipo de estrategia para garantizar la sobrevivencia de muy pequeños agronegocios a escala local, conviviendo en los intersticios de los desarrollos competitivos de las grandes empresas lácteas (Remaud, 2003).

Así mismo un ejemplo de la funcionalidad de este tipo de estrategias, es el caso que se vivió en la región de Cotija, donde a final de los años 90', un grupo de académicos empezaron un proyecto para la obtención de una denominación de origen para un queso tradicional en riesgo de desaparecer, el queso Cotija, del nombre de un pueblo de la región de donde está originado. Pero existe "otra versión" de este queso, el queso designado como queso tipo Cotija, del mismo formato, solo que producido y elaborado en condiciones diferentes y con otro proceso. Su fabricación es difundida en casi toda la República, especialmente en el Occidente (Jalisco y Michoacán) y en el sureste del país (Veracruz y Chiapas). Frente a la competencia del queso "tipo" Cotija, en un mercado donde la diferenciación de los productos es a menudo limitada, la versión "original" del queso Cotija no podía competir en los mercados convencionales. Estaban en riesgo de desaparecer los últimos productores de queso Cotija, unas 200 familias rancheras "refugiadas" en la sierra de Jalmich, y con ellos un patrimonio territorial con un sistema de producción sustentable que brindaba alternativas de desarrollo para una región marginada. Es por eso que fue trascendental que México intentará por primera vez obtener la denominación de origen para un producto alimenticio artesanal, cuya calidad está fuertemente relacionada con su territorio de origen (Poméon, 2007).

El 30 de noviembre del 2005, el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) entregó la Marca Colectiva Región de Origen al Queso Cotija, la cual representa una

protección oficial y con ella una ventaja competitiva del producto en el mercado, dando garantía de autenticidad y calidad a los consumidores y un sobreprecio para los productores; sobreprecio justificado por las especificidades geográficas y culturales incorporadas en el producto por las condiciones precarias en que éstos producen y por el apego a determinadas normas de calidad y por la preservación del medio ambiente.

Hoy día el auténtico queso Cotija es el primer producto alimenticio procesado artesanalmente que ostenta una marca colectiva en México, además de haber sido reconocido entre 500 participantes como el mejor “queso extranjero del año” en el campeonato mundial de quesos de calidad que se realizó en Cremona, Italia a finales del 2006. Sin embargo aún quedan grandes retos, entre los cuales está el comprobar químicamente la autenticidad de este producto para lograr la denominación de origen.

III.4.1. Delimitación de la zona de producción del queso Cotija: la sierra de Jalmich

La zona productora del auténtico queso Cotija tiene una forma de herradura orientada al norte, abarca una superficie de aproximadamente 2 400 km², de los 19°15' a los 19°40' de latitud norte y de los 102°30' a los 103°05' de longitud oeste (ver el figura 7). La temperatura media anual de la Sierra de Jalisco y Michoacán (Jalmich), va de los 25°C al sur, a los 20°C y se registra una precipitación media anual de entre 900 mm al sur y 1200 mm en los tres puntos cardinales que forman el arco de la herradura. Es una zona continua, ubicada en la sierra Jalmich, entre los estados de Jalisco y de Michoacán, incluyendo principalmente los municipios de Santa María del Oro (Jalisco) y la parte sur de los municipios de Cotija y de Tocumbo (Michoacán). Además se extiende a territorio de los municipios siguientes: norte de Jilotlán de los Dolores, oriente de Tamazula, sur de Valle de Juárez y de Quitupan (Jalisco); suroeste de los Reyes, Periban y Tancitaro, y norte de Buena Vista Tomatlán (Michoacán). En realidad, los municipios que se involucraron en la denominación de origen y que cuentan con más productores participando en el proceso de calificación del queso Cotija para lograr la denominación de origen, son seis: Santa María del Oro, Jilotlán de los Dolores y Quitupan en Jalisco; Cotija, Tocumbo y Buena Vista Tomatlán en Michoacán (Poméon, 2007).



Figura 7: Mapa de zona de producción del queso Cotija, según definida por las reglas de uso de la marca colectiva queso “Cotija región de origen” (la parte colorida en verde y marrón indica la zona de producción delimitada) (fuente: Pomeón, 2007).

Es en este medio específico que pastorea el ganado vacuno productor de la leche con la cual se elabora el queso Cotija. Las características de clima, altura y suelo originan una vegetación típica del lugar, que se refleja en la composición y las características de la leche producida. Por otra parte, la humedad relativa de la zona, vinculada a la temperatura, las lluvias y la altura, se relaciona con las características del queso elaborado y añejado en la zona.

III.4.2. Definición del Auténtico Queso Cotija

Actualmente no existe una norma en México que regule la elaboración de quesos con leche bronca por lo que en realidad aún se carece de información legal que defina a este producto en su totalidad; sin embargo puede definirse como: Queso maduro elaborado de leche bronca de bovino proveniente de ganado criollo alimentado en praderas naturales de libre pastoreo con producciones de leche únicamente en la época de lluvias (julio a octubre), producido de forma artesanal a partir de leche entera, sin la adición de compuestos químicos o análogos de leche u otros ingredientes que no sean sal y cuajo, libre de microorganismos patógenos y que se caracteriza por ser un queso salado, de pasta dura, prensado, no cocido y sometido a maduración un mínimo de tres meses de vida dentro del área geográfica que protege la marca colectiva Queso Cotija región de Origen, considerando el inicio de su vida a partir del retiro de la prensa cilíndrica que le da su forma de aproximadamente 40 cm. de diámetro y 18 cm. de altura, con peso de alrededor de 20 kg. Con una composición básica de 10 L de leche en cada Kilo de queso, humedad máxima de 36%, grasa mínima de 23% y proteína mínima del 25%.

Este queso se podrá subclasificar comercialmente por su tiempo de añejamiento y su consistencia.

- Por su tiempo de añejamiento, afinado o maduración, se clasificará en: Añejo, cuando tenga de tres a seis meses de vida. Rendido, cuando tenga más de seis meses de vida.
- Por su consistencia y características al corte, el productor lo podrá clasificar como: De tajo, aquel que no se desmorona al corte y las paredes se mantienen en su posición, debido al menor contenido de sal y mayor contenido de grasa sobre el total de la materia seca.
- De grano, cuando se desmorona al corte por su mayor contenido de sal y materia seca. De medio tajo o de medio grano, condición intermedia entre ambos (Álvarez, Barragán y Chombo, 2004).

III.4.3. Proceso de elaboración del Auténtico Queso Cotija

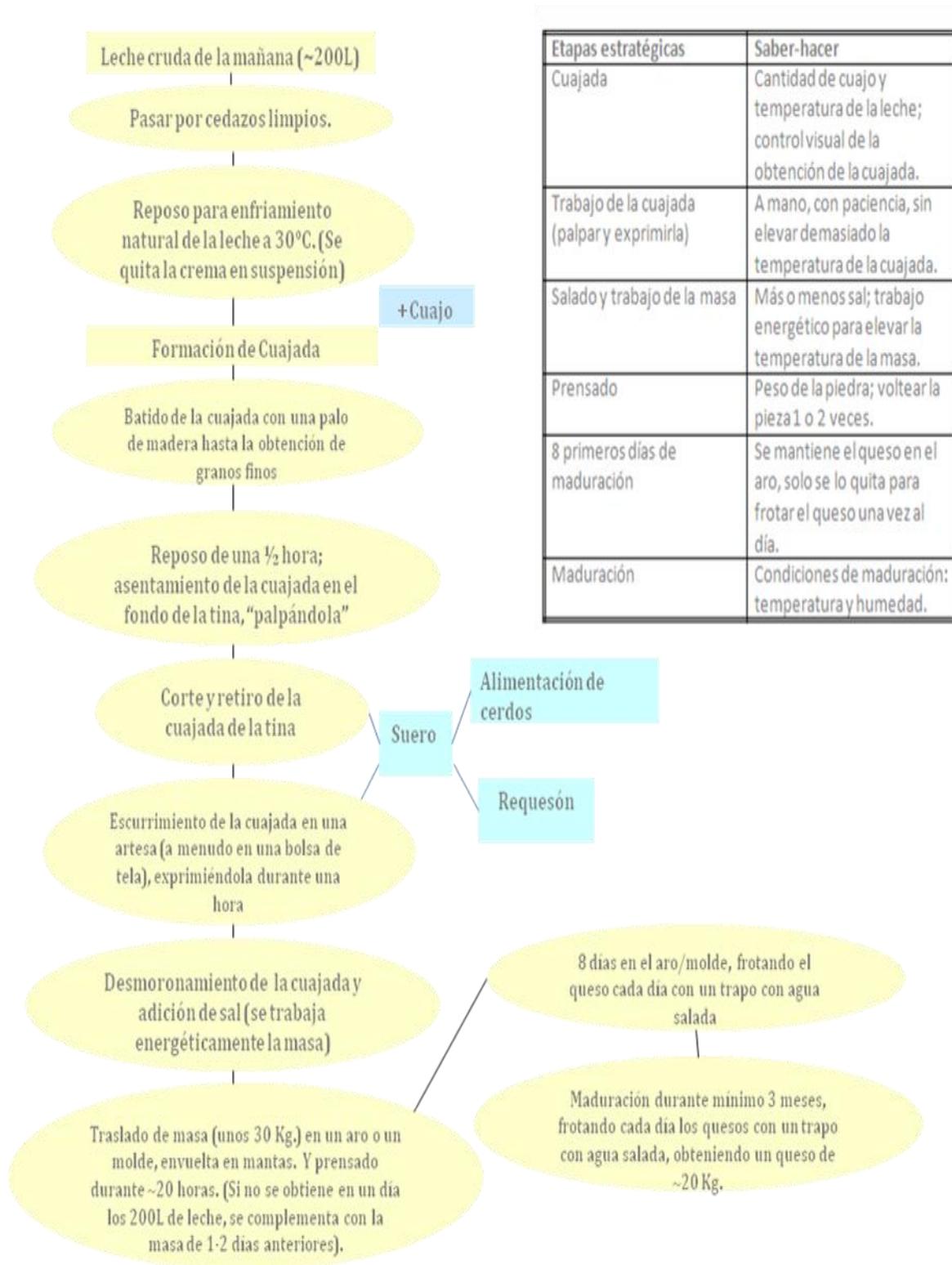
Las condiciones y el proceso de elaboración del queso Cotija varían de acuerdo al estado, región y/o productor, sin embargo basado en la reglas de uso (Álvarez, Barragán y Chombo; 2004), Pomeón (2007) realizó una recopilación de las características en común que guardaban varios procesos para contar con una metodología general de elaboración del queso Cotija, el que se muestra en la figura 8.

Los pasos a seguir durante la obtención del queso Cotija son:

- *Recepción de la leche:* La leche que se utilice debe ser recién ordeñada de la mañana.
- *Pasar la leche por cedazos limpios:* De esta forma se obtiene leche libre de materia extraña.
- *Reposar la leche.* La leche se coloca en recipientes de acero inoxidable limpios, donde permanecen aproximadamente durante un periodo de 3 a 4 horas a temperatura ambiente para su enfriamiento natural (30° C) antes de de agregar el cuajo.
- *Adición de cuajo:* Se realiza empleando cuajo líquido de diferentes marcas comerciales (Cuamex, Cuajo XXX estandarizado, enzimas coagulantes de leche bovina); la dosificación no es precisa en ningún caso y puede acompañarse de una parte total de la sal añadida, según la costumbre.
- *Formación de Cuajada.* Ésta se realiza añadiendo cuajo líquido de marcas comerciales. La dosificación no es precisa en ningún caso consta más bien del “saber -hacer” y del control visual de la obtención de la cuajada.
- *Batido de la cuajada:* Se realiza de forma manual empleando un palo de madera y requiere de paciencia para la obtención de granos finos pero cuidando no elevar demasiado la temperatura.
- *Reposo de la cuajada.* Dura aproximadamente media hora y da tiempo para el asentamiento de la cuajada en el fondo de la tina (es posible ayudarle a bajar -asentar”- de manera manual o ejerciendo presión con una cuchara de acero inoxidable).

- *Corte de la cuajada.* Se realiza con palas de madera o con la mano, generando un cortado tosco. Esto repercute en pérdidas de caseína lo cual se refleja en el rendimiento y calidad del producto final.
- *Desuerado:* Se practica por medio de sifoneo, drenado o por colador.
- *“Manteado ó escurrimiento de la Cuajada”:* Tiene como propósito desuerear la cuajada por auto compresión, esta operación dura 1 hora, para la cual se emplean bolsas de algodón o plástico.
- *Desmoronamiento de la Cuajada y salado:* Son operaciones simultáneas. Normalmente el queso es salado entre 4 y 5% de sal en base húmeda y debe trabajarse enérgicamente la masa para elevar su temperatura.
- *Moldeado:* La masa es trasladada a un aro (cincho, cinturón o fajo del diámetro específico) cubierto en su interior con dos bandas de ixtle (fibra de maguey) con las que se envolverá la masa, las que confieren en conjunto la forma y el volumen de pasta, que a su vez habrá de dar lugar a las piezas con la presentación tradicional cilíndrica de alrededor de 20 kg. Permanece aquí durante 8 días donde debe ser frotado diariamente con un trapo con agua salada.
- *Prensado:* Tiene como objeto eliminar el suero intersticial de la masa del queso, se emplean lozas de entre 50 y 90 Kg. Tiene una duración aproximada de 20 horas al finalizar las piezas se desmoldan y se fajan con lámina, tela o fibra de vidrio. A partir de esta etapa se considera que inicia la vida de cada pieza de queso.
- *El queso se desfaja (se le quita el aro),* cuando la consistencia es adecuada pero se continua volteándolo, alternando la cara expuesta al medio diariamente, durante los primeros tres meses de su vida.
- *Maduración:* En realidad, comienza desde el término del moldeado pues es aquí donde comienza a orearse. La superficie del queso se limpia -”soba”- durante los tres primeros meses de su elaboración, con un trapo limpio, suave pero que no desprenda hilos o materia extraña que pueda poner en riesgo la calidad del queso.

Figura 8. Diagrama de Elaboración del Auténtico Queso Cotija.
(Fuente: Poméon, 2007).



IV. Objetivos

IV.1 Objetivo General

- Estudiar la influencia de la región y productores en que se elaboran los quesos Cotija originales en la proteólisis que se lleva a cabo durante la maduración del queso y su influencia en la liberación de péptidos con posible actividad biológica.

IV.2 Objetivo Específicos

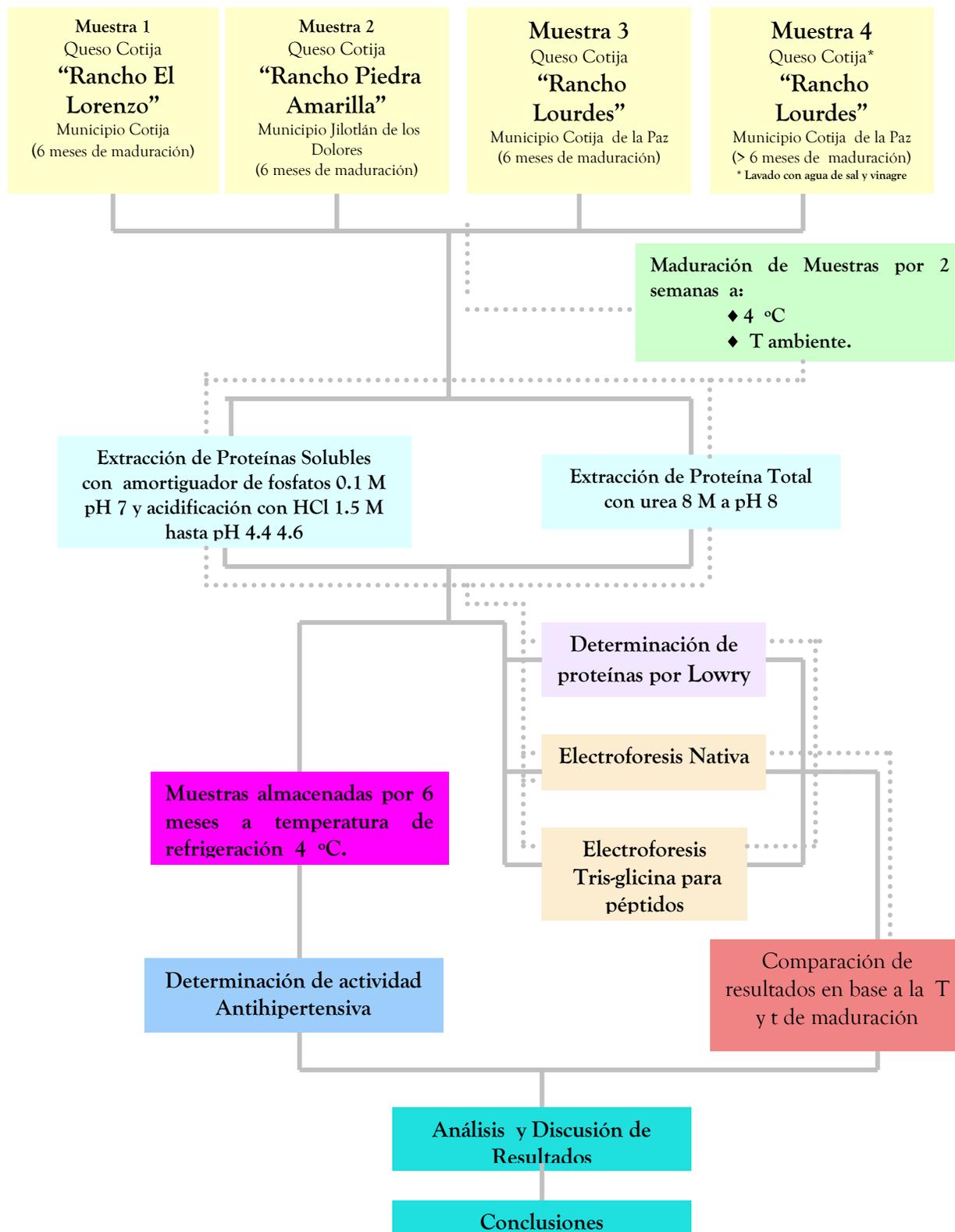
- Comprobar mediante electroforesis nativa y de péptidos, si durante la maduración de los quesos se lleva a cabo la generación de péptidos.
- Identificar los péptidos liberados a lo largo de la maduración de los quesos y determinar por comparación con la bibliografía si existen péptidos con posible actividad biológica.
- Evaluar el potencial antihipertensivo de diferentes extractos de proteína soluble y total obtenidos del auténtico queso Cotija elaborados en diferentes regiones de la Sierra de Jalmich.
- Evaluar las diferencias entre productos como modelo de que los péptidos retienen actividad biológica.

V. Hipótesis

En la etapa de maduración del auténtico queso Cotija se lleva a cabo un proceso proteolítico que ocasiona la subsecuente liberación de péptidos de bajo peso molecular que depende de los sistemas proteolíticos de los microorganismos presentes en la zona donde el queso fue elaborado, por lo que si éstos cambian por la temperatura de maduración del queso, cambiará también el perfil de péptidos en el producto terminado.

VI. Metodología

VI.1 Diagrama Experimental



VI. 2 Origen de las Muestras

Los auténticos quesos Cotija empleados en este análisis, fueron elaborados por productores que cuentan con el registro en la Marca Colectiva. Se adquirieron durante la VII feria regional del queso Cotija, la cual fue celebrada del 26 al 30 de Diciembre del 2006 en el municipio de Cotija de la Paz, Michoacán.

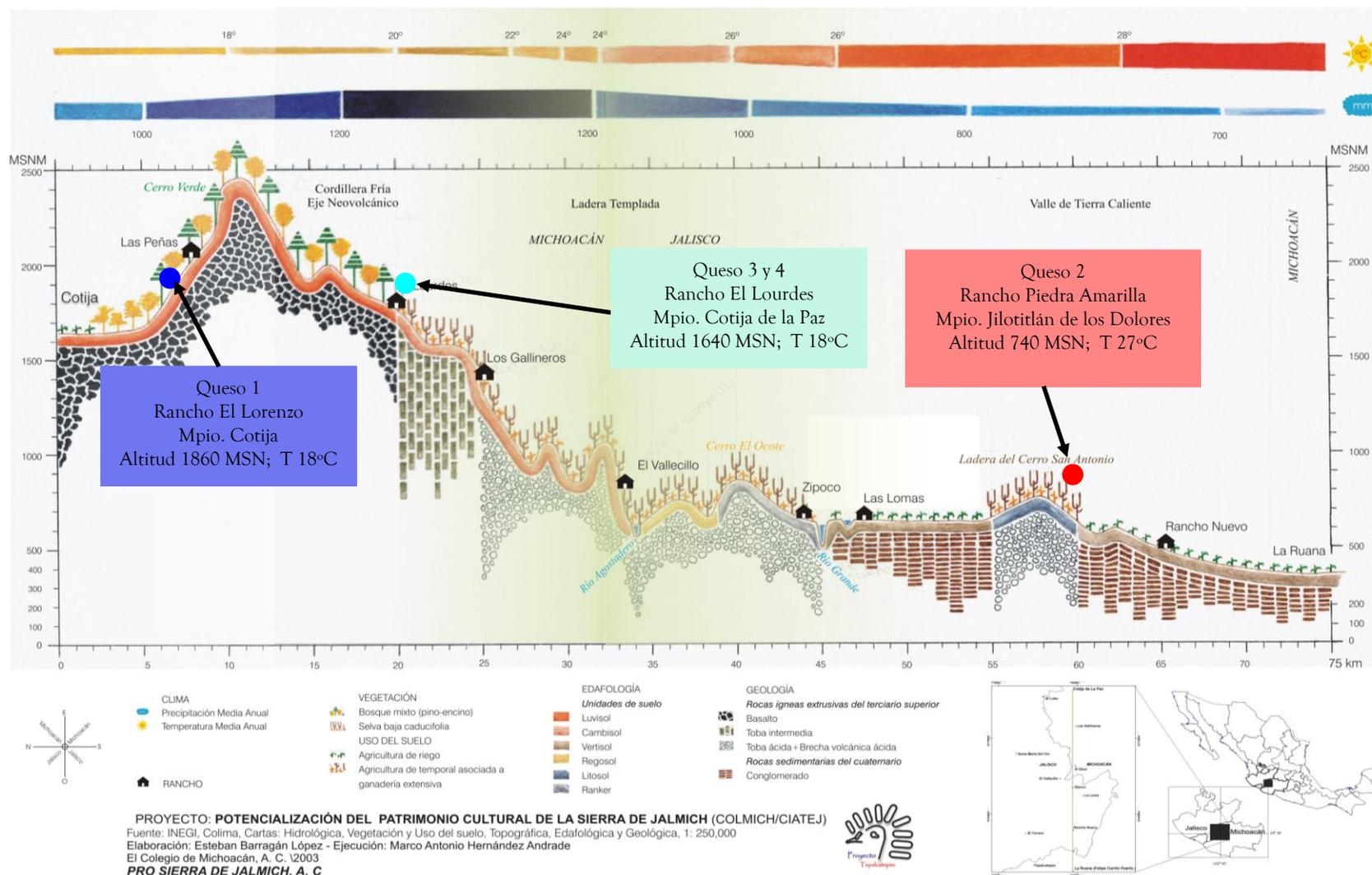
Las muestras de queso se compraron al mismo tiempo y debido a que no se emplearon de manera inmediata, los quesos se almacenaron en oscuridad a 4 °C hasta el momento de la evaluación. Los quesos empleados en este trabajo fueron los siguientes:

Tabla 3. Productores de los auténticos Quesos Cotija estudiados

Muestra	Productor	Lugar
1	Familia Sánchez	Municipio Cotija, Michoacán. Rancho El Lorenzo
2	Familia Sandoval	Municipio Jilotitlán de los Dolores, Jalisco. Rancho Piedra Amarilla
3	Crescencio Chávez Barajas	Municipio Cotija de la Paz, Michoacán. Rancho Lourdes
4	Crescencio Chávez Barajas	Municipio Cotija de la Paz, Michoacán. Rancho Lourdes **** durante su proceso de elaboración es lavado con agua de sal y vinagre. Este proceso disminuye el aw como consecuencia de una mayor cantidad de cloruro de sodio presente.

A lo largo del estudio las muestras serán identificadas por su lugar de producción, sin embargo, debido a que algunas muestras provienen del mismo municipio, se asignó un número a cada una; la numeración asignada se muestra en la tabla 3 expuesta arriba, así mismo para mostrar la ubicación geográfica de origen de cada muestra, en la siguiente página se muestra un mapa (VI.3. Situación geográfica de los auténticos quesos Cotija analizados) situando cada uno de los quesos estudiados, indicando el Rancho de donde provienen, así como la altitud y temperatura de cada sitio.

VI.3. Situación Geográfica de los Auténticos Quesos Cotija Analizados.



(Fuente: Pomeón, 2007).

VI.4. Obtención de los Extractos Proteicos

VI.4.1. Extracción de Proteínas Solubles

Fundamento: Las proteínas del suero, que representan alrededor del 20% de las proteínas de la leche de vaca, se definen como aquéllas que se mantienen en solución tras precipitar las caseínas a pH 4.6, a una temperatura de 20°C y se pueden determinar en el extracto acuoso del queso. Una vez concluido este tratamiento en las muestras, se procedió a determinar la proteína presente en solución por el método de Lowry que se basa en la interacción de las proteínas con los reactivos de fenol y cobre bajo condiciones alcalinas.

Procedimiento:

Las muestras de queso Cotija se disuelven en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 7 (5g/25 ml) ajustando el pH final de la disolución a 4.4-4.6 con HCl 1.5 M, a 20 °C.

Finalmente la disolución se filtra a través de un filtro Whatman No. 42 y se mantiene en refrigeración hasta la realización de los análisis (Arenas, 2006).

VI.4.2. Extracción de Proteínas Totales

Fundamento: Las caseínas exhiben solubilidad y estabilidad al calor por encima de pH 6 (Fenema, 1993). En este método se trabaja a pH alcalino (8.0) para asegurar que la caseína del queso se disuelva. La centrifugación ayuda a separar los sólidos de líquidos de diferente densidad mediante una centrífuga, provocando la sedimentación del sólido o de las partículas de mayor densidad que finalmente serán removidas mediante filtración. Una vez concluido este tratamiento en las muestras, se procedió a determinar la proteína presente en solución por el método de Lowry que se basa en la interacción de las proteínas con los reactivos de fenol y cobre bajo condiciones alcalinas.

Procedimiento:

Se utilizó una solución de urea 8 M pH 8, en la cual se disolvió 0.6 g de cada muestra de queso Cotija en 25 mL de solución. Después de homogenizar dos minutos, se sometió la disolución en un baño de agua a 37° C durante dos horas para solubilizar las caseínas del queso.

Posteriormente se centrifugó a 10 000 r.p.m. a 4°C por tres minutos. Se realizó la remoción de grasas y sólidos insolubles mediante filtración en papel Whatman No. 42 (Arenas, 2006).

VI.5. Determinación de Proteína por el Método de Lowry

Fundamento: Esta técnica se basa en el desarrollo del color que se produce al reaccionar las proteínas con iones cúpricos y con el reactivo Folín, en dos etapas que se describen a continuación:

1.- En condiciones alcalinas, el cobre (Cu^{2+}) forma un complejo con los enlaces peptídicos de las proteínas (reacción de Biuret), reduciéndose a Cu^+ (Lowry, Rosebrough, Farr, Randall; 1951).

2.- El Cu^+ junto con la tirosina y el triptófano, reacciona con el reactivo de Folín originando un compuesto inestable que se reduce lentamente hasta dar lugar al reactivo molibdeno tungstíco de color azul. Dependiendo fundamentalmente de su contenido en tirosina y triptófano las proteínas producen un color azul de distinta intensidad (Yabar, 2003).

Procedimiento:

1. Se mezcló 50 volúmenes de A +1 volumen de B + 1 volumen de C. A esta mezcla se le denominó solución trabajo.
2. Se tomó 5 mL de la solución de trabajo + 1 mL de muestra **
3. Se dejó reposar 10 min. en la oscuridad.
4. Se agregó 0.5 mL de D 1:1 con agua destilada.
5. Se dejó reposar 30 min. en la oscuridad.
6. Finalmente se leyó absorbancia a 590nm.

** Extractos de proteína soluble 125 μL diluido en 875 μL de agua para conformar 1 mL de muestra.
 Extractos de proteína total 100 μL diluido en 900 μL de agua para conformar 1 mL de muestra.

La curva patrón de seroalbúmina (SA sigma E.U.A.) se preparó en un intervalo de concentración de 0 a 500 $\mu\text{g}_{\text{SA}}/\text{mL}$ obteniéndose la siguiente ecuación:

$$C(\mu\text{g}/\text{mL}) = (\text{Abs}_{\lambda 590} - 0.0501) / 0.0016$$

$$R=0.9833$$

VI.6. Maduración de Muestras

Fundamento: La temperatura de maduración es un factor que afecta la actividad enzimática retrasándola a temperaturas bajas (4°C) y acelerándola a temperatura altas 21 °C.

Procedimiento:

Se obtuvieron dos lotes iguales de muestras. Cada lote fue preparado con una porción de 10 g de queso por cada muestra; las porciones obtenidas fueron colocadas de forma individual en pequeños vasos de plásticos que a su vez fueron tapados y etiquetados. Las condiciones de maduración para cada lote fueron las siguientes:

- ◆ Maduración durante 2 semanas a una T 21°C.
- ◆ Maduración durante 2 semanas a una T 4°C.

Una vez concluido el lapso de maduración, se obtuvieron los extractos proteínicos de cada lote según el punto VI.4 con el fin de determinar su contenido de proteína por el método de Lowry, así como de su patrón electroforético.

VI.7. Técnicas Electroforéticas

VI.7.1 Electroforesis Nativa en gel de poliacrilamida

Fundamento: La electroforesis es un método analítico en el que se separan biomoléculas por la acción de un campo eléctrico, éstas migran en función de su carga, su peso y su estructura tridimensional hacia el cátodo o el ánodo (García, 2000). En términos particulares la electroforesis nativa también llamada no desnaturizante, se caracteriza por no utilizar dodecil sulfato de sodio (SDS) en los buffer, ya que este compuesto actúa rompiendo enlaces no covalentes en las proteínas, desnaturizándolas, provocando que estas moléculas proteicas pierdan su conformación nativa.

Preparación de muestras

Se tomaron alícuotas de 40 μL de los extractos proteínicos de caseína y lactosuero y se depositaron en tubos eppendorff de 1 mL para disolver con 20 μL de buffer de la muestra y se agitó la mezcla en el vortex, para depositar 15 μL de cada solución en el gel concentrador.

Preparación de Estándar de Bajo Rango

El estándar de proteínas se compone de 6 proteínas cuyos pesos moleculares van de 14.4 a 97.4 kDa. Se tomó una alícuota de 2 μL del estándar de bajo rango (Catalogo No. 161-0304 BIO-RAD) y se disolvió con 36.5 μL de buffer de la muestra y 1.5 μL de β -mercaptoetanol; se mantuvieron 5 minutos en un baño de agua hirviendo, antes de depositar 15 μL en el gel concentrador.

Preparación del stock de acrilamida

El gel de acrilamida consta de dos fases: una fase inferior (gel de separación) y otra superior (gel de concentración). Para evitar la presencia de burbujas de aire en los gels, estos se

desgasificaron durante 15 minutos, antes de añadir el TEMED y el persulfato amónico (catalizadores de la reacción de entrecruzamiento).

Se preparó un gel de separación con una T de 12.5% y una C del 6% con un pH de 8.8. Para evitar la formación de meniscos en el gel, se depositó en la superficie de la mezcla, un pequeño volumen de agua y se dejó polimerizar durante 1 hr. Una vez transcurrido el tiempo se retiró el agua de la superficie para depositar la solución del gel de concentración (T del 4%, C de 6% con pH de 6.8) e introducir el peine que forma los pocillos donde se depositarían las muestras. Finalmente, la mezcla se polimerizó durante 1 hr. quedando listo el gel para colocar las muestras y el estándar para realizar la electroforesis.

Condiciones de la separación electroforética

La electroforesis se realizó en un sistema Miniprotean II (Bio-Rad) con una fuente de poder Power/Pac 300 de (Bio-Rad), la intensidad de corriente se mantuvo constante a 200 V dejando migrar las muestras hasta que el frente de corrida llegase al extremo inferior de los cristales en un tiempo aproximado de 1 hr.

Debido a que el calor producido por el voltaje empleado altera las condiciones electroforéticas la cámara de electroforesis se mantuvo en hielo durante todo el tiempo de corrida.

Tinción del gel

Terminada la electroforesis el gel se sumergió en la solución de tinte (azul de Coomassie (250mg) -metanol- agua desionizada- ácido acético al 40-50-10% v/v) donde se mantuvo durante 1 hr. Concluido el tiempo de tinción se colocó en una solución desteñidora (metanol- agua desionizada- ácido acético al 40-50-10% v/v) donde permanecieron hasta lograr la visión de las bandas que conforman el patrón electroforético, para finalmente calcular su movilidad electroforética (Rf).

VI.7.2. Electroforesis de Péptidos.

Fundamento: El principio básico de la electroforesis consiste en la migración de las moléculas a través de un gel u otro tipo de matriz de naturaleza porosa, en el cual, por acción de un campo eléctrico, serán separadas de acuerdo a su tamaño o peso molecular.

En este tipo de electroforesis a diferencia de la electroforesis nativa se utilizan agentes desnaturizantes de proteínas, como pueden ser: detergentes (SDS), caótrofos (urea) y agentes reductores (2- mercaptoetanol, DTT). Cuando las proteínas se solubilizan en presencia del detergente aniónico SDS, éste se une a las proteínas, rompiendo interacciones hidrofóbicas y desnaturizándolas. Las proteínas desnaturizadas de la muestra adoptarán una estructura cargada negativamente a lo largo de la cadena polipeptídica. Como media, se une una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos. La carga nativa original de la molécula está completamente enmascarada por la carga negativa del SDS. Debido a que la cantidad de SDS que se une a las proteínas es prácticamente proporcional a su tamaño, los complejos SDS-proteínas presentan un valor carga/masa constante y por lo tanto se separan de acuerdo a su tamaño cuando migran desde el cátodo al ánodo a una velocidad relacionada con su peso molecular. Además del SDS, se emplean otros agentes desnaturizantes como son un agente reductor, generalmente el 2-mercaptoetanol que reduce los puentes disulfuro (Cys-S-S-Cys) a grupos tioles (Cys-SH), y agentes caótrofos, que como la urea, rompen puentes de hidrógeno. Para asegurar la disociación de las proteínas en sus subunidades y la pérdida de la estructura secundaria de las proteínas se suele calentar la muestra antes de ser cargada en el gel. A diferencia de la electroforesis en condiciones nativas, en la SDS-PAGE las proteínas se separan únicamente en función de su tamaño.

Preparación de muestras

Se tomaron alícuotas de 40 μL de los extractos proteínicos de caseína y suero y se depositaron en tubos eppendorff de 1 mL para disolver con 20 μL de buffer de la muestra (agua desionizada, buffer tris- HCl 0.5M pH 6.8, glicerol, SDS 10%, β -mercaptoetanol, Coomasie

0.5%) y se agita la mezcla en el vortex, para depositar 15 μL de cada solución en el gel concentrador.

Preparación de estándar de polipéptidos

El estándar de polipéptidos se compone de 6 polipéptidos cuyos pesos moleculares van de 1.4 a 26.6 kDa. Se tomó una alícuota de 2 μL del estándar polipéptidos (Catalogo No. 161-0326 BIO-RAD) y se disolvió con 36.5 μL de buffer de la muestra y 1.5 μL de β -mercaptoetanol; se mantuvieron 5 minutos en un baño de agua hirviendo, antes de depositar 15 μL en el gel concentrador.

Preparación de los geles

El gel consta de dos fases: una fase inferior (gel de separación) y otra superior (gel de concentración). Para evitar la presencia de burbujas de aire en los geles, estos se desgasificaron durante 15 minutos, antes de añadir el TEMED y el persulfato amónico.

Se preparó un gel de separación con una T de 18% y una C del 6% con un pH de 8.45. Para evitar la formación de meniscos en el gel, se depositó en la superficie de la mezcla, un pequeño volumen de agua y se dejó polimerizar durante al menos 16 hrs.

Una vez transcurrido el tiempo se retiró el agua de la superficie para depositar la solución del gel de concentración (T del 4%, C de 6% con pH de 8.45) e introducir el peine que forma los pocillos donde se depositarían las muestras. Finalmente, la mezcla se polimerizó durante 1 hr. quedando listo el gel para realizar la electroforesis.

Condiciones de la separación electroforética

La electroforesis se realizó en un sistema Miniprotean II (Bio-Rad) con una fuente de poder Power/Pac 300 de (Bio-Rad), la intensidad de corriente se mantuvo constante a 30 V en

un período aproximado de 2hrs.; posterior a este período cuando el azul de Coomasie G-250 incluido en el tampón de solubilización de las muestras, mostró la llegada de las proteínas al gel de separación, la intensidad se modificó, fijándola en 90 V dejando migrar las muestras hasta que el frente de corrida llegase al extremo inferior de los cristales en un tiempo aproximado de 8 hrs.

Es importante mencionar que durante todo el tiempo de corrida, la cámara de electroforesis se mantuvo en hielo ya que el alto voltaje causa un calor excesivo que puede alterar la electroforesis.

Tinción del gel

Finalizada la electroforesis, se procedió a desmontar los cristales del equipo y sacar los geles para ser fijados en una solución desteñidora (metanol- agua desionizada- ácido acético al 50-40-10% v/v) donde permanecieron por espacio de una hora.

Posteriormente los geles fueron enjuagados con agua desionizada y colocados en SYPRO RUBY de Bio-Rad, por un lapso de 17 horas. Transcurrido este período los geles fueron enjuagados con agua desionizada y se procedió a tomar imagen de éstos en el Gel-Doc 100 de Bio-Rad, con interface a una computadora Pentium con el programa Molecular Analyst.

* *La preparación de las soluciones utilizadas para los geles de electroforesis se presenta en la sección XI.3.*

VI.8. Determinación de Actividad Antihipertensividad en Extractos Proteínicos

Fundamento: La enzima convertidora de angiotensina (ECA) cataliza la conversión de angiotensina I en angiotensina II (compuesto de elevada potencia vasoconstrictora). La enzima posibilita también la fragmentación del sustrato hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL) en ácido hipúrico y en el dipéptido histidil-leucina. Esta reacción se interrumpe con la adición de ácido clorhídrico (HCl), y el ácido hipúrico liberado se liga al cloruro cianúrico. En este estudio se realizó un patrón de 0 y 100% de actividad de la enzima para poder compararlo con la actividad encontrada en las muestras analizadas. De existir péptidos antihipertensivos en los extractos de suero y caseína provenientes de los quesos Cotija capaces de inhibir la enzima convertidora de angiotensina (ECA), se observa una disminución de la absorbancia del ácido hipúrico liberado en la reacción medida a 230 nm.

Una unidad de actividad ECA se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μmol de ácido hipúrico por minuto y por litro de suero a 37 °C.

La determinación de la actividad inhibitoria de la ACE se realizó optimizando las condiciones del método descrito por Cushman y Cheung (1971) y modificado por Fuglsang y col., (2002).

Procedimiento:

1. Se tomó 1 mL de los extractos proteínicos correspondientes de cada queso; en el caso de los extractos del suero, la concentración fue de 5g de queso /25mL y para los extractos de caseína la concentración era de 0.6g de queso/ 25mL. El pH de cada muestra se ajustó a 8.3 con NaOH 10N.
2. Se prepararon los tubos Eppendorf con las muestras correspondientes, así como los tubos correspondientes al blanco o actividad 0% y actividad 100 %. Las cantidades añadidas a cada uno se indican en la tabla 4.

Tabla 4. Forma de preparación de muestras para la determinación del porcentaje de inhibición de la ECA en los quesos Cotija.

	ACTIVIDAD 0%	ACTIVIDAD 100%	MUESTRAS
Muestra	-----	-----	80 μ L
Solución de enzima ECA (Pulmón de conejo; 1U/ mL)	-----	20 μ L	20 μ L
Agua	20 μ L	-----	-----
Buffer de Boratos (0.3M NaCl, 0.1 M ácido bórico, pH 8.3)	80 μ L	80 μ L	-----
Buffer de Sustrato (0.3M NaCl, 0.1 M ácido bórico, y 5 mM Hipuril-Histidil-Leucina, pH 8.3)	200 μ L	200 μ L	200 μ L

3. Los tubos ya preparados y etiquetados fueron colocados en un baño a 37°C e incubados por 1 hora.
4. Al concluir el tiempo de incubación se adicionó 250 μ L de HCl 1N a cada tubo para detener la reacción.
5. A continuación se adicionó 1.7 mL (1700 μ L) de acetato de etilo y se volteó tres veces cada tubo con la finalidad de extraer el ácido hipúrico.
6. Se procedió a centrifugar (Beckman modelo J2-MI) a 4500 rpm por 5 min.
7. Se tomaron 400 μ L del contenido de la fase orgánica de cada tubo y se paso a otro tubo limpio y seco para evaporar el acetato de etilo a 95 °C por 30 minutos.
8. Después de la evaporación se resuspendieron los residuos de cada tubo hasta el momento de ir leyendo en el espectro a una longitud de onda de 230 nm, adicionando 2 mL de agua destilada y agitando en el vortex. La actividad de cada muestra se determinó por duplicado.

El porcentaje de inhibición de la ECA (% IECA) se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ IACE} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blanco}}}$$

Acontrol (actividad 100%): Absorbancia del ácido hipúrico formado tras la acción de la ECA sin inhibidor.

Ablanco (actividad 0%): Absorbancia del HHL que no ha reaccionado y que ha sido extraído con el acetato de etilo.

Amuestra: Absorbancia del ácido hipúrico formado tras la acción de la ECA en presencia de sustancias inhibidoras.

VII. Resultados y Discusión

VII.1. Determinación del contenido de proteína obtenido por el método de Lowry a diferentes condiciones de maduración.

La determinación de proteína en los extractos de los quesos estudiados en diferentes tiempos y temperaturas de maduración (ver tabla 5 y gráfico 1), mostró mayor cantidad de proteína extraíble conforme avanzaba el tiempo de maduración, lo cual sugiere que durante la maduración del queso continúa el proceso proteolítico que se refleja en la producción de péptidos; más aún, al comparar las diferentes temperaturas de almacenamiento se observó que cuando el almacenamiento se daba a temperatura ambiente la cantidad de proteína determinada era mayor que la observada en el mismo tiempo de maduración a temperatura de refrigeración, sugiriendo que las reacciones enzimáticas se ven disminuidas a temperatura de 4 °C.

A partir de este punto es importante aclarar que a lo largo de este estudio se considerará al inicio de la maduración, como el punto a partir de donde se comenzó el análisis de las muestras y en el cual las muestras se encontraban en condiciones naturales de maduración tal como fueron traídas del lugar de origen con un tiempo aproximado de maduración de 6 meses de maduración a excepción de la muestra 4 que presentaba un tiempo mayor a 6 meses.

La determinación de concentración de proteína total inicial de cada queso mostró que, aunque todos los quesos provenían de la Sierra de Jalmich, sí existe una diferencia en el contenido proteínico de cada muestra, siendo las muestra 3 (10.8g de proteína total /100g de queso) y 4 (10.4 g de proteína total / 100g de queso), ambas del Rancho Lourdes las que contenían mayor cantidad de proteína. Las de menor concentración fueron la muestra 1 (8.56 g de proteína total / 100g de queso) proveniente del Rancho El Lorenzo y la muestra 2 (7.26g de proteína total / 100g de queso) proveniente del Rancho Piedra Amarilla. En el caso de la concentración de proteína soluble inicial, la de mayor contenido fue la muestra 1 (1.42 g de proteína soluble / 100g de queso) proveniente del Rancho El Lorenzo, seguidas por la muestra 2 (0.98 g de proteína soluble / 100g de queso) del Rancho Piedra Amarilla y finalmente las

muestras 3 (0.67g de proteína soluble / 100g de queso) y 4 (0.55g de proteína soluble / 100g de queso) del Rancho Lourdes; esto sugiere que en las muestras 1 y 2 el proceso proteolítico va más avanzado que en los otros 2 quesos. Esto podría deberse a la situación geográfica de los ranchos en los que se elaboraron los quesos, pues los 2 provenientes del mismo rancho muestran características semejantes, mientras que los otros 2 quesos que se elaboraron en regiones muy separadas son muy diferentes. El hecho de que en los quesos elaborados en el rancho El Lorenzo y Piedra Amarilla lleven un mayor grado de proteólisis puede deberse a los diferentes microorganismos característicos de cada región, pues puede haber microorganismos más proteolíticos que otros.

Tabla 5. Comparación del contenido de proteína obtenido por Lowry a diferentes tiempos y temperaturas de maduración.

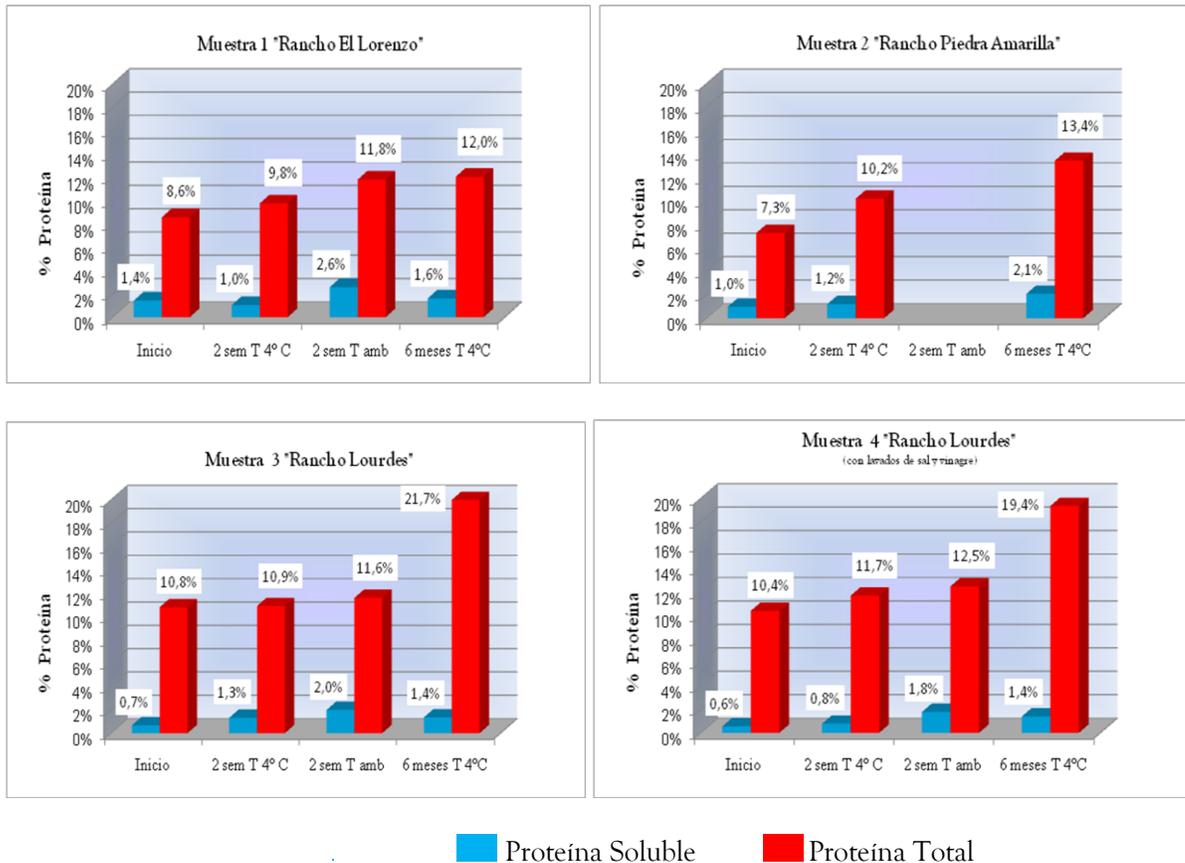
% Proteína								
Condiciones de Maduración								
	Condición Inicial		2 Semanas T 4°C		2 Semanas T Ambiente		6 Meses T 4°C	
	Proteína Soluble	Proteína Total	Proteína Soluble	Proteína Total	Proteína Soluble	Proteína Total	Proteína Soluble	Proteína Total
Muestra 1 "Rancho Lorenzo" T 18°C	1.42 %	8.56 %	1.03 %	9.75 %	2.57 %	11.8 %	1.61 %	12.04 %
Muestra 2 "Rancho Piedra Amarilla" T 27°C	0.98 %	7.26 %	1.02 %	10.2 %	*	*	2.08 %	13.43 %
Muestra 3 "Rancho Lourdes" T 18°C	0.67 %	10.8 %	1.32 %	10.9 %	1.99 %	11.6 %	1.36 %	21.68 %
Muestra 4 "Rancho Lourdes" T 18°C	0.55 %	10.4 %	0.78 %	11.7 %	1.78 %	12.5 %	1.40 %	19.35 %

*Esta muestra no soportó la maduración

La tabla 5 permite observar que para el caso de la proteína derivada de la caseína, el aumento en la concentración de proteína con respecto a la inicial y comparando los valores obtenidos entre quesos la tendencia fue la siguiente: muestra 3(10.88% mayor que la inicial) > muestra 4 (8.95% mayor que la inicial) > muestra 2 (6.17% mayor que la inicial) > muestra 1 (3.48% mayor que la inicial). En tanto que para la concentración de suero se observó el siguiente comportamiento: muestra 2 (1.1% mayor que la inicial) > muestra 4 (0.89% mayor que la inicial) > muestra 3 (0.69% mayor que la inicial) > muestra 1(0.19% mayor que la inicial). Estos datos permiten observar claramente como el queso 3 del rancho Lourdes presentó aparentemente mayor actividad proteolítica durante el almacenamiento refrigerado. Este queso proviene de las regiones más frías de la Sierra de Jalmich situado por la cordillera fría del eje neovolcánico (ver mapa VI.2 de situación geográfica de los auténticos Quesos Cotija), por lo que se puede suponer que los microorganismos de esa región resisten mejor las temperaturas bajas que aquellos originarios de las zonas más calientes.

El gráfico 1 representa el comportamiento observado en la concentración de proteína, luego de seis meses de maduración a temperatura de refrigeración (4°C) y permitió observar que la concentración de proteína aumentó en todos los casos con respecto a la concentración inicial.

Gráfico 1. Ilustración de la comparación del contenido de proteína obtenido por Lowry a diferentes tiempos y temperaturas de maduración en los auténticos quesos Cotija.



Así mismo podemos ver que de las tres cinéticas experimentadas, todos los quesos alcanzan su mayor concentración de proteína, luego de un lapso de maduración 6 meses a temperatura de refrigeración (4°C), lo cual refleja que a mayor tiempo de maduración existe una mayor proteólisis en los quesos.

Cabe mencionar que la muestra número 4 del Rancho Lourdes no mostró ninguna descomposición visual por hongos durante la cinética de maduración a temperatura ambiente por dos semanas, y sin duda este hecho se relaciona directamente con el lavado de sal y vinagre al que es sometido este queso en especial, ya que este proceso disminuye el aw como

consecuencia de una mayor cantidad de cloruro de sodio presente (García, 2006). Además crea un ambiente selectivo que inhibe las bacterias contaminantes causantes de putrefacción y detiene el crecimiento de microorganismos.

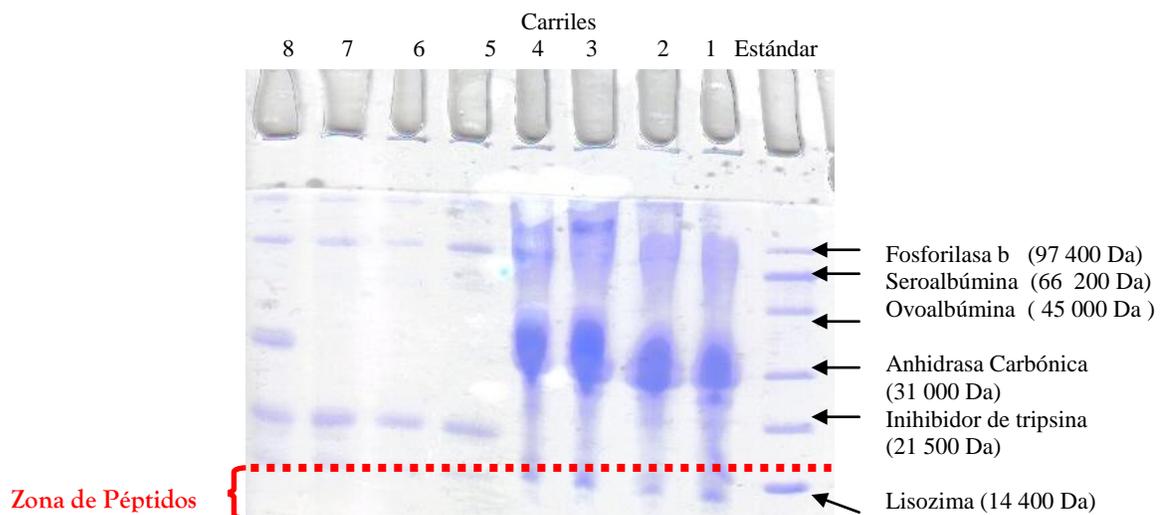
No obstante es importante no perder de vista que los aumentos y las variaciones en las fracciones proteicas de los quesos analizados, además de deberse probablemente a las regiones geográficas donde se elabora cada producto, también pueden estar influenciadas por factores tales como: raza, sistemas de alimentación, período de lactancia, diferentes formas de manejo y composición en la variación de los componentes principales de la leche que en conjunto repercuten en las características fisicoquímicas y sensoriales de los quesos (Vega y León y col., 2003).

VII.2. Determinación de péptidos por electroforesis en los Auténticos quesos Cotija.

VII.2.1. Electroforesis Nativa de los extractos proteínicos de las muestras en la etapa inicial de su maduración.

La primera parte del análisis electroforético, consistió en someter los extractos de proteína soluble y total (muestras en condiciones naturales a las que llegaron del lugar de origen) provenientes de los auténticos quesos Cotija, a una electroforesis nativa (figura 9, ver anexo XI.3.1) con la finalidad de constatar si éstos presentaban bandas inferiores a 14 400 Da y debido a que en efecto, se observaron dichas bandas siendo mas evidentes en las muestras de proteína total, se procedió a realizar una electroforesis de péptidos y continuar con el experimento.

Figura 9. Separación de péptidos por electroforesis nativa en gel de poliacrilamida 30% (T,C 3%, 200 V) de extractos de proteína total y proteína soluble encontrados al inicio de la maduración



Orden de las muestras:

Carril 1= Proteína Total del Queso Rancho El Lorenzo (Municipio Cotija)

Carril 2= Proteína Total del Queso Rancho Piedra Amarilla (Mpio. Jilotitlán de los Dolores Jalisco)

Carril 3= Proteína Total del Queso Rancho Lourdes (Mpio. Cotija de la Paz)

Carril 4= Proteína Total del Queso Rancho Lourdes* (lavado con sal de agua y vinagre) (Mpio. Cotija de la Paz)

Carril 5= Proteína Soluble del Queso Rancho El Lorenzo (Mpio. Cotija)

Carril 6= Proteína Soluble del Queso Rancho Piedra Amarilla (Mpio. Jilotitlán de los Dolores Jalisco)

Carril 7= Proteína Soluble del Queso Rancho Lourdes (Mpio. Cotija de la Paz)

Carril 8= Proteína Soluble del Queso Rancho Lourdes con lavados de sal y vinagre (Mpio. Cotija de la Paz)

VII.2.2. Determinación de péptidos y pesos moleculares generados a diferentes tiempos y temperaturas de maduración

El objetivo principal de este estudio fue caracterizar por electroforesis los péptidos extraídos de la matriz del queso en los extractos de proteína soluble y total, y establecer el patrón electroforético en las diferentes condiciones de maduración (ver anexo XI.3.2).

La determinación de pesos moleculares se llevó a cabo calculando la movilidad electroforética relativa (Rf) de cada una de las bandas observadas en los geles (figuras 10, 11 y 12), por medio del programa integrado Gel Doc de Bio Rad, Molecular Analyst. Se generaron las curvas correspondientes para el patrón de pesos (anexo XI.5) y se efectuó el cálculo de pesos moleculares de los péptidos.

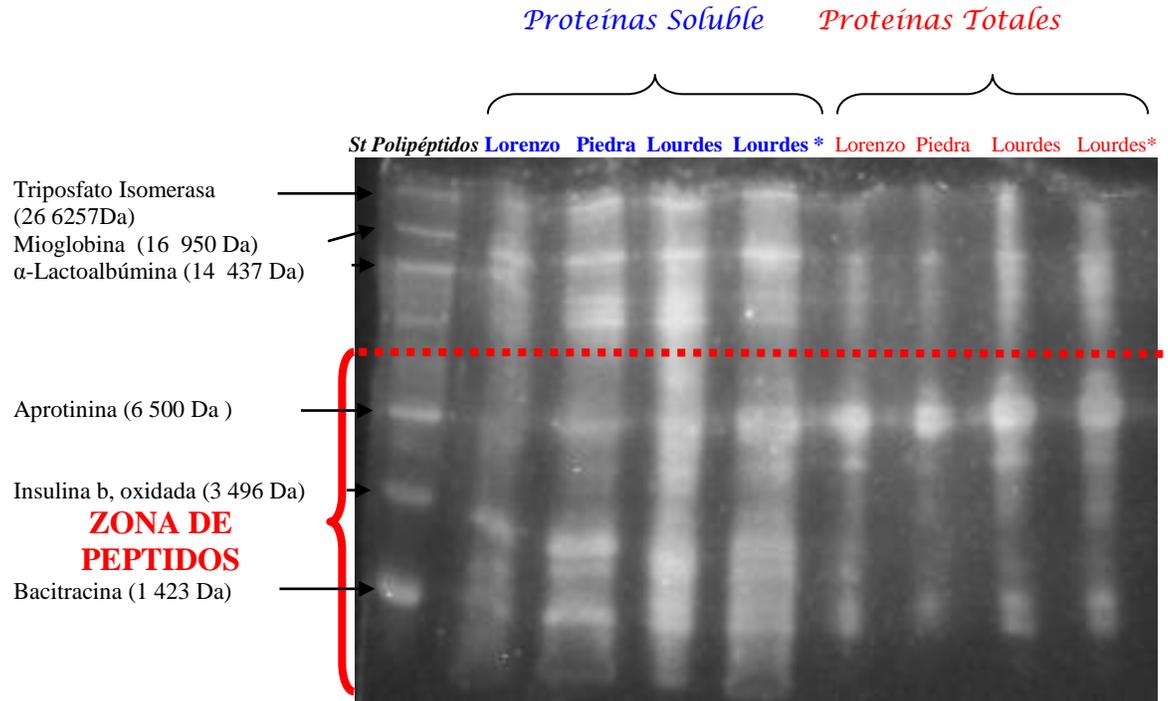
Las figuras 10, 11 y 12 muestran los perfiles electroforéticos de las diferentes muestras. En todos los casos se observó un mayor número de bandas en el área inferior a 14 437 Da (peso molecular correspondiente a la α -Lactoalbúmina) lo cual permite diferenciar entre péptidos y proteínas. Sin embargo, los fragmentos a los que a lo largo de este trabajo se hizo referencia como posibles péptidos bioactivos en los quesos analizados fueron aquéllos situados en el intervalo de 6500-410 Da, ya que es dentro de este rango de peso molecular que la literatura reporta la mayor cantidad de péptidos con función biológica.

VII.2.3. Determinación de péptidos y pesos moleculares encontrados al inicio de la maduración.

La determinación de péptidos en esta etapa (Tabla 6), resultó ser donde se localizó la mayor cantidad de péptidos nuevos, tanto en la parte proveniente de la matriz de proteína total, como en proteína soluble. Así mismo, cabe destacar que el aumento del perfil peptídico observado fué más notorio en la parte proteínica extraída del suero (probablemente por el tipo de peptidasas) y más aún en los quesos provenientes del Rancho Lourdes situado en el Municipio Cotija de la Paz, los cuales presentaron 11 péptidos ubicados en el suero, entre el rango de 5223.96 a 817.33 Da.

En todos los casos se observó que aunque las bandas obtenidas en los geles analizados a diferentes condiciones de maduración son similares entre sí, también se presentaron bandas en diferente posición, lo que indica, que probablemente exista una flora bacteriana característica de cada queso como consecuencia de la región donde fueron elaborados, razón por la cual, las proteínas solubles y totales en cada queso son metabolizadas de diferente forma produciendo péptidos dependiendo de su especificidad proteolítica. Esta variabilidad de péptidos pudieron ser el resultado de la acción de las enzimas y microorganismos que degradaron la caseína en la leche cruda durante su almacenamiento ó en la etapa inicial de maduración de queso, produciendo péptidos, los cuales se trasladan al suero del queso y causan que se detecte una mayor cantidad de péptidos en esta parte de la matriz proteica. Además, de que sin duda, es al inicio de la maduración el momento en que los quesos presentan una mayor cantidad y diversidad de flora bacteriana, ya que es cuando existe una mayor actividad acuosa que favorece la existencia de la flora bacteriana. Sin embargo es importante considerar que la causa más acertada de que se presenten la mayor cantidad de péptidos de bajo peso molecular (menores a 1kDa) durante esta etapa, es debido a que durante este tiempo específico es cuando existe la mayor cantidad de secuencias peptídicas de mayores pesos moleculares (4, 5 y 6 kDa), las cuales a su vez se hidrolizan en péptidos de peso molecular intermedio (2, 3 kDa) para luego degradarse en péptidos de menor peso molecular que pueden tener importancia biológica y que obedece al fenómeno conocido como la formación escalonada de péptidos el cual fue reportado por Gasson y De Vos en 1994(Ver figura 10).

Figura 10. Separación de Péptidos en Gel de Poliacrilamida 49% (T=18 %, C=6%; 30V gel de separación y 90V gel de concentración) encontrados al Inicio de la Maduración de los quesos



* Este queso fue sometido a lavados con agua de sal y vinagre.

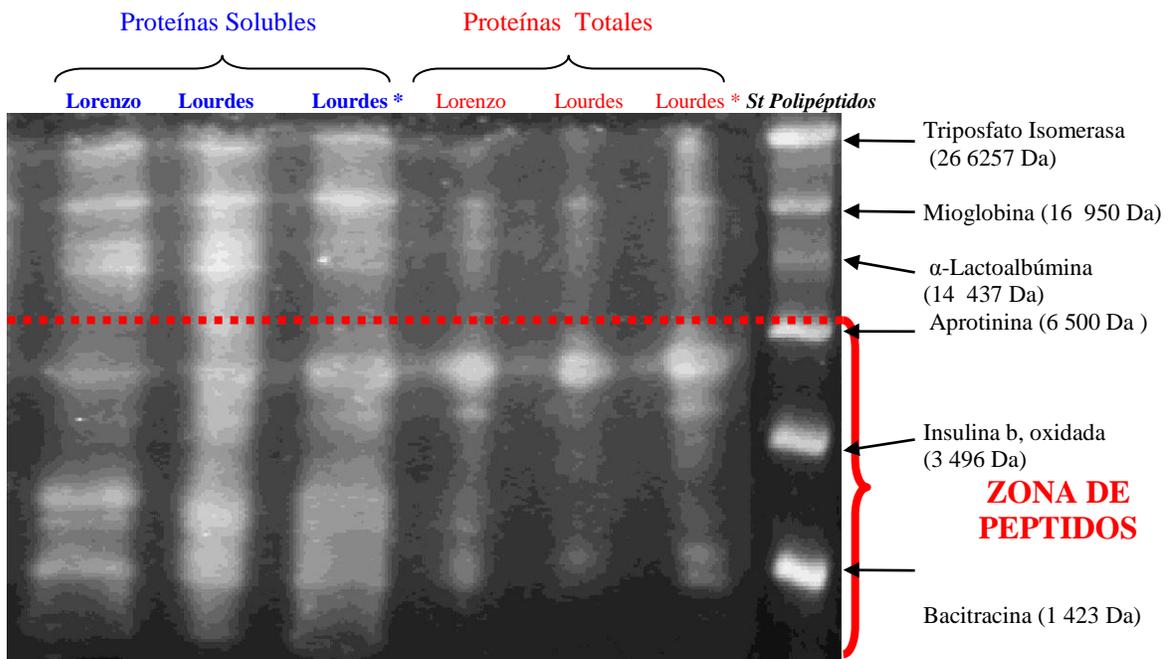
Tabla 6. Pesos moleculares de péptidos entre el rango de 6 500 a 450 Da encontrados en los auténticos Quesos Cotija durante el revelado del gel de electroforesis al Inicio de la Maduración.

		Inicio de la Maduración							
		QUESOS							
		Quesos 1 El Lorenzo		Queso 2 Piedra Amarilla		Queso 3 Lourdes		Queso 4 Lourdes (lavados con sal y vinagre)	
PESOS MOLECULARES (Da)		Proteína Soluble	Proteína Total	Proteína Soluble	Proteína Total	Proteína Soluble	Proteína Total	Proteína Soluble	Proteína Total
		4574.04	5223.96	4996.89	4996.89	5223.96	5223.96	5223.96	5223.96
		2639.39	4377.24	4574.04	4006.82	4377.24	4006.82	4574.04	3934.59
		1976.51	4006.82	3213.66	2941.71	3833.54	3358.15	4006.82	2941.71
		1516.35	2256.83	2256.83	1249.97	3213.66	2576.32	3358.15	2576.32
		892.69	1891.04	1976.51		2814.49	1891.47	2693.39	1656.53
			1731.41	1388.03		2358.3	1584.89	2358.3	1270.57
			1388.03	975.21		2066.33	1270.57	1809.25	
			1113.27			1516.35		1584.89	
						1270.57		1328.31	
						932.82		932.82	
						817.33		817.33	

VII.2.4. Determinación de los pesos moleculares encontrados después de la maduración por 2 semanas a Temperatura Ambiente (21 °C).

El patrón electroforético observado luego de someter los quesos a un período de maduración por 2 semanas a temperatura ambiente (21° C) muestra que las condiciones de temperatura aceleraron los procesos enzimáticos degradando las proteínas y liberando una mayor cantidad de péptidos que los obtenidos a temperatura de refrigeración (4 °C) (figura 11).

Figura 11. Separación de Péptidos en Gel de Poliacrilamida 49% (T=18 %, C=6%; 30V gel de separación y 90V gel de concentración) encontrados después de madurar 2 semanas T. Amb. (21°C) los quesos Cotija.



- Este queso fue sometido a lavados con agua de sal y vinagre.

Tabla 7. Pesos moleculares de péptidos entre el rango de 6 500 a 450 Da encontrados en los auténticos Quesos Cotija durante el revelado del gel de electroforesis después de madurar 2 semanas a Temperatura Ambiente (21° C).

2 semanas a Temperatura Ambiente 21°C						
PESOS MOLECULALES (Da)	QUESOS					
	Quesos 1 El Lorenzo		Queso 3 Lourdes		Queso 4 Lourdes (lavado con sal y vinagre)	
	<i>Proteína Soluble</i>	<i>Proteína Total</i>	<i>Proteína Soluble</i>	<i>Proteína Total</i>	<i>Proteína Soluble</i>	<i>Proteína Total</i>
	5239.62	4206.3	5717.42	5717.42	5717.42	5717.42
	4026.24	2276.14	4593.04	5760.89	5566.73	4593.04
	2960.74	1827.68	4026.24	2960.74	5014.18	4026.24
	2378.48	1344	3377.54	1533.2	4206.3	2960.74
	1909.41		2834		2960.74	1909.41
	1444.77		2378.48		2378.48	1533.2
	905.73		1909.41		2178.21	1286.47
			1642.86		1909.41	
			1231.12		1533.2	
			866.96		1286.47	
					866.76	
					793.96	

Los pesos moleculares en la tabla 7 indican que de los tres quesos que se soportaron las condiciones de maduración a 21°C, el queso 4 del rancho Lourdes situado en el municipio de Cotija de la Paz, destacó por haber sido en el que se distinguieron un mayor número de péptidos (12) en la proteína soluble, lo que resultó coincidente con la determinación de proteína por Lowry que indicó que durante la cinética de temperatura ambiente este queso fue el que mayor concentración de proteína contenía.

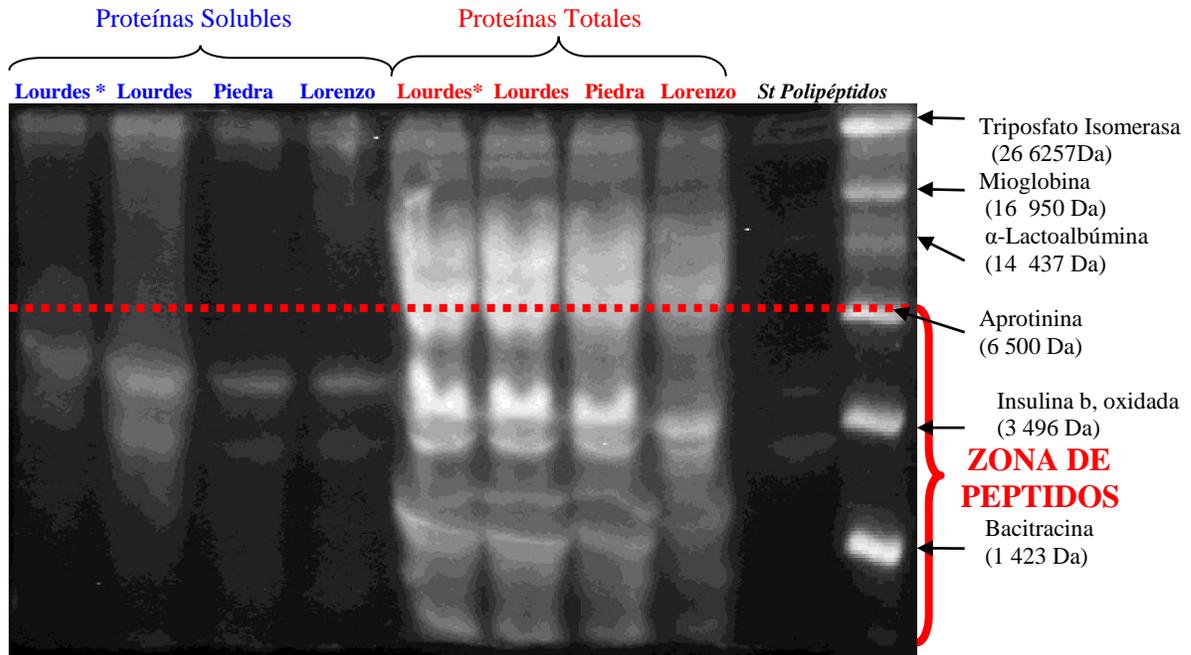
Otra característica observada dentro de este lapso de maduración, fue que a diferencia del perfil peptídico de proteína total observado al inicio de la maduración, en esta cinética los péptidos observados fueron aún menos (4 y 7 péptidos encontrados de pesos moleculares mayores (5717 a 1286 Da) a los determinados en el periodo inicial de maduración (5223 a 1113 Da)), por lo cual es evidente que la microbiota de los quesos (a temperatura ambiente 21 °C) degradó con muchas más facilidad las proteínas solubles que las proteínas totales. Sin embargo aunque, no se observó la formación de un gran número de péptidos como se esperaba,

sí se observó la formación de péptidos de peso molecular inferior a 1000 Da, sobre todo en el queso número 4 del rancho de Lourdes situado en el municipio Cotija de la Paz, lo cual confirma que las condiciones de temperatura aceleran las reacciones enzimáticas y que favorecen la proteólisis de las proteínas en forma escalonada como lo reportan Gasson y De Vos en 1994, generando péptidos de bajo peso molecular.

VII.2.5. Determinación de los pesos Moleculares encontrados en después de la maduración por 2 semanas a Temperatura de Refrigeración (4 °C).

De acuerdo a este comportamiento observado podría confirmarse que el efecto de la baja temperatura (4 °C), retardó la velocidad de las reacciones enzimáticas y procesos bioquímicos y como consecuencia de este efecto, el número de péptidos derivados de la proteína soluble que se venía observando en los quesos al inicio de la maduración y luego de la maduración a temperatura ambiente, disminuyó drásticamente en todos los quesos y solo se generaron entre 3 y 2 péptidos (Tabla 8). Esto podría deberse a que los microorganismos presentes en los quesos continúen consumiendo los péptidos liberados a mayor velocidad de la que las proteasas los producen, o bien al hecho de que la proteólisis continúa degradando los péptidos hasta aminoácidos, por lo cual ya no es posible detectarlos por electroforesis. Sin embargo no se descarta la posibilidad de que los quesos pudieron comenzar a deshidratarse perdiendo con ello péptidos, o bien la misma flora de microorganismos presente en cada queso optó por consumir primero la proteína soluble que le fue más fácil de degradar para su consumo. Es por ello quizá que en las proteínas derivadas de la caseína ó proteína total, se observó totalmente lo contrario en todos los quesos y se logró observar una mayor cantidad de péptidos (9 y 10). Cabe destacar que fue durante esta cinética de maduración donde se generaron péptidos de menor peso molecular derivados de las caseínas (6388.52 a 784.69 D), los cuales son los de mayor interés por ser de los más reportados en la literatura como bioactivos (Clare y Swaisgood, 2000).

Figura 12. Separación de Péptidos en Gel de Poliacrilamida 49% (T=18 %, C=6%; 30V gel de separación y 90V gel de concentración) encontrados después de madurar 2 semanas a 4 °C los quesos Cotija.



* Este queso fue sometido a lavados con agua de sal y vinagre.

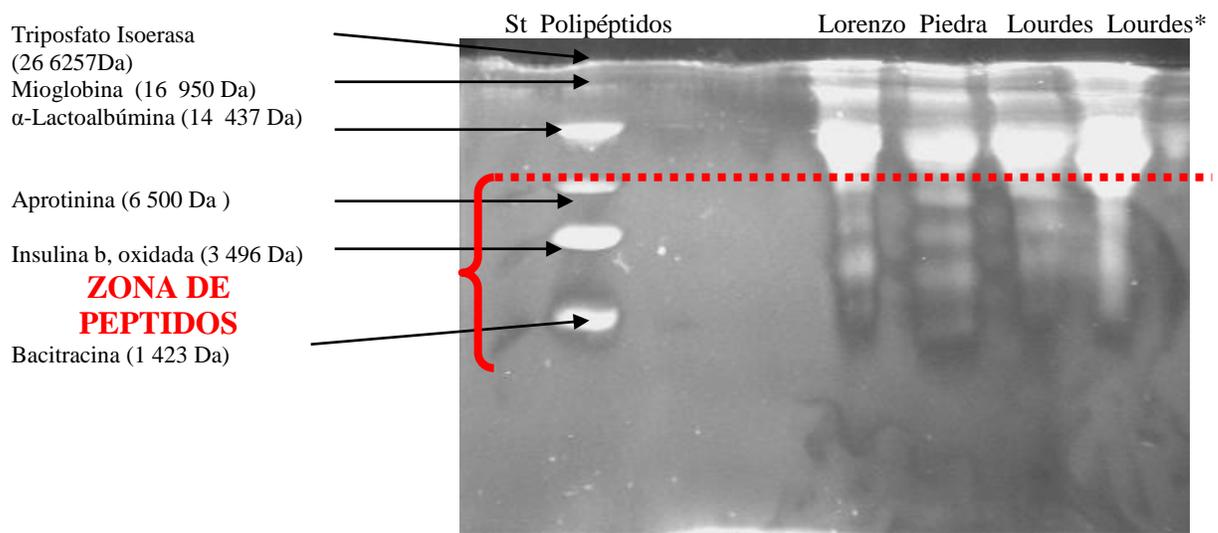
Tabla 8. Pesos moleculares de péptidos entre el rango de 6 500 a 450 Da encontrados en los auténticos Quesos Cotija durante el revelado del gel de electroforesis después de madurar 2 semanas a Temperatura de Refrigeración (4° C).

2 Semanas a Temperatura de Refrigeración 4° C								
PESOS MOLECULARES (Da)	QUESOS							
	Quesos 1 El Lorenzo		Queso 2 Piedra Amarilla		Queso 3 Lourdes		Queso 4 Lourdes (lavado con sal y vinagre)	
	Proteína Soluble	Proteína Total	Proteína Soluble	Proteína Total	Proteína Soluble	Proteína Total	Proteína Soluble	Proteína Total
	4569.83	6388.52	4567.72	5402.56	4764.31	5633.78	5402.56	6388.52
	2879.39	4380.26	2879.39	4380.26	3131.84	4380.26	3551.4	5402.56
	1741	3265.13	1669.55	3551.4	1974.24	3551.4		4380.26
		2761.85		2879.39		2879.39		3551.4
		2335.61		2058.73		2058.73		2879.39
		2147.34		1669.55		1669.55		2058.73
		1669.55		1193.71		1472.31		1945.36
	1193.71		853.49		1244.8		1534.97	
	853.49				1052.69		1244.8	
					784.69		928.32	

VII.2.6. Determinación de los pesos Moleculares encontrados después de madurar 6 meses a Temperatura de Refrigeración (4 °C).

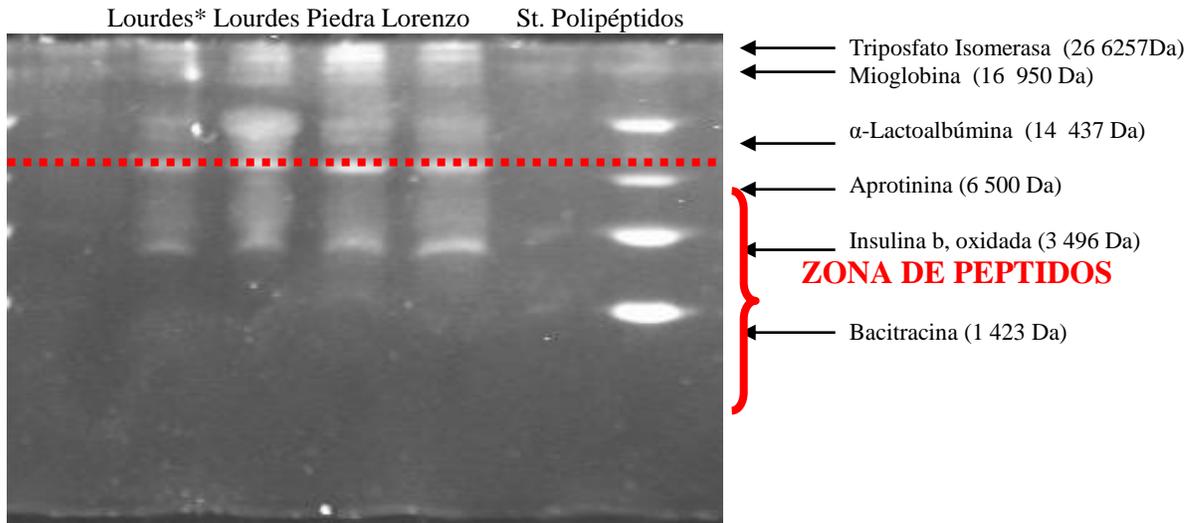
La tabla 9 en conjunto con las figuras 13 y 14 reportan los pesos moleculares de los péptidos encontrados al término de la maduración de 6 meses en condiciones de refrigeración. La tendencia de los resultados comparada con la observada durante las otras cinéticas experimentadas y al inicio de la maduración, indicó que la cantidad de péptidos generados durante este período fue menor a cualquier otra y que además, el sistema proteolítico expuesto a estas condiciones sufrió una inhibición, ya que todos los quesos analizados presentaron una disminución en la generación y cantidad de segmentos peptídicos que a su vez limitaron la formación de péptidos de bajo peso molecular (menores a 1000 Da), e impidiendo que se llevara a cabo el fenómeno reportado por Gasson y De Vos en 1994, conocido como la formación escalonada de péptidos. De hecho autores como Nighswonger y col., (1996) describieron en un estudio realizado que algunas bacterias no sobreviven al almacenamiento en condiciones de refrigeración y sufren autólisis. Sin embargo no se descarta la idea que este comportamiento pudo haber sido causado por un consumo de péptidos por la misma flora microbiana o bien, porque los péptidos se perdieron tras la deshidratación de los quesos.

Figura 13. Separación de Péptidos de Proteínas Totales en Gel de Poliacrilamida 49% (T=20 %, C=6%; 30V gel de separación y 90V gel de concentración) después de 6 meses de Maduración a Temperatura de Refrigeración (4°C) de los quesos Cotijas



* Este queso fue sometido a lavados con agua de sal y vinagre.

Figura 14. Separación de Péptidos de Proteína Soluble en Gel de Poliacrilamida 49% (T=20 %, C=6%; 30V gel de separación y 90V gel de concentración) después de 6 meses de Maduración a Temperatura de Refrigeración (4°C) de los quesos Cotija



* Este queso fue sometido a lavados con agua de sal y vinagre.

Tabla 9. Pesos moleculares de péptidos entre el rango de 6 500 a 450 Da encontrados en los auténticos Quesos Cotija durante el revelado del gel de electroforesis después de madurar 6 meses a Temperatura de (4° C).

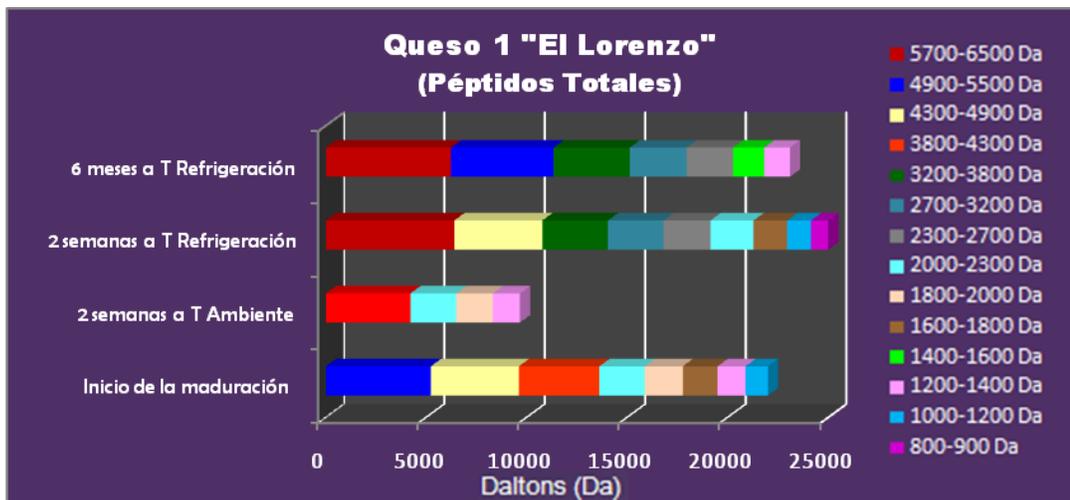
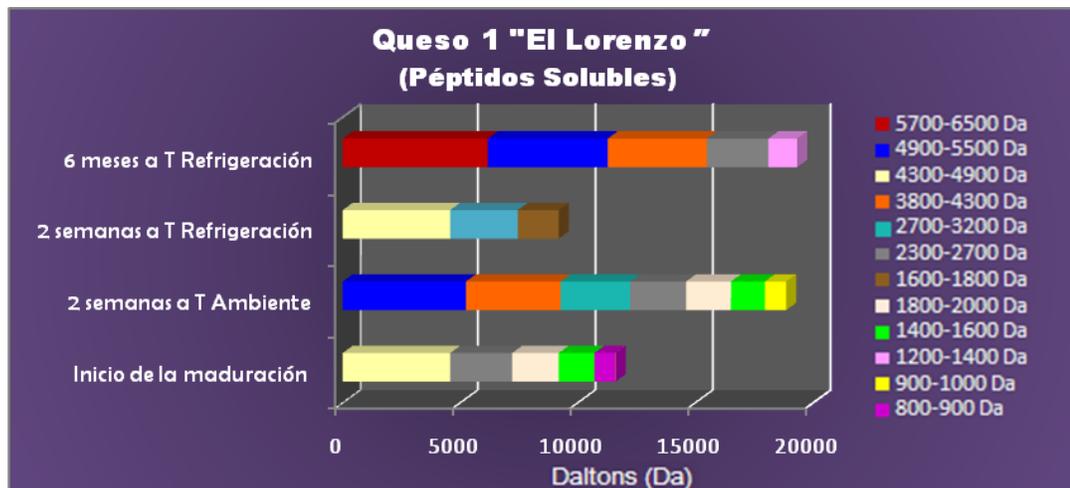
		6 Meses a Temperatura de Refrigeración 4° C							
		QUESOS							
PESOS MOLECULARES (Da)	Quesos 1 El Lorenzo		Queso 2 Piedra Amarilla		Queso 3 Lourdes		Queso 4 Lourdes (lavado con sal y vinagre)		
	Proteína Soluble	Proteína Total	Proteína Soluble	Proteína Total	Proteína Soluble	Proteína Total	Proteína Soluble	Proteína Total	
	6168.79	6224.43	6481.86	5637.67	6481.86	5637.67	6481.86	6224.43	
	5099.17	5107.4	5357.97	3793.15	5357.97	4625.94	5892.5	4625.94	
	4216.96	3794.02	4430.98	2312.06	4430.98	3793.15	4430.98	3793.15	
	2620.59	2819.68	3026.91	1156.38	4028.1	2553.88		2819.68	
	1223.77	2312.06	1711.2		3026.91	1556.68		1718.3	
		1556.68			1414.49				
		1276.44							

Para resumir el comportamiento de los péptidos encontrados a lo largo de las cinéticas experimentadas, se presentan a continuación los gráficos de los quesos analizados a las diferentes condiciones de maduración experimentadas donde se puede observar más fácilmente

bajo que condiciones de temperatura y tiempo de maduración se formaron la mayor cantidad de péptidos siguiendo de forma escalonada.

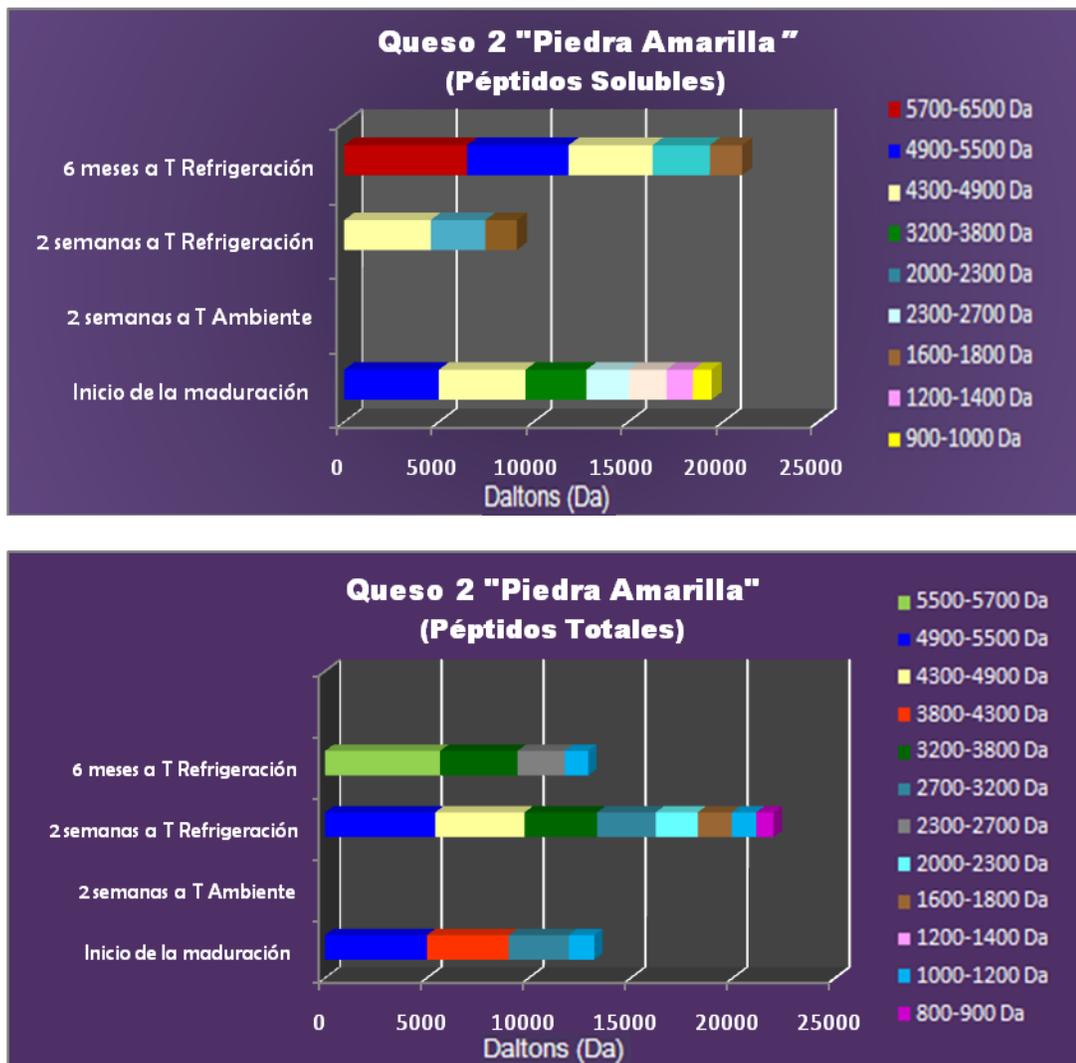
En el gráfico 2 se observa que en general en todas las condiciones experimentadas de maduración, existe una degradación de péptidos de forma escalonada, sin embargo la mayor variedad de péptidos encontrados fue en extracto de proteína total y bajo condiciones de refrigeración (4°C) por 2 semanas, fenómeno que refleja la viabilidad de la cuenta bacteriana ya que se mantuvo aún en condiciones de refrigeración y luego de 6 meses, permitiendo así que las actividad enzimática continuara degradando los péptidos de mayor tamaño para dar lugar a otros de menor peso molecular.

Grafico 2. Péptidos encontrados en Proteína Soluble y Proteína Total en el Queso del Rancho El Lorenzo



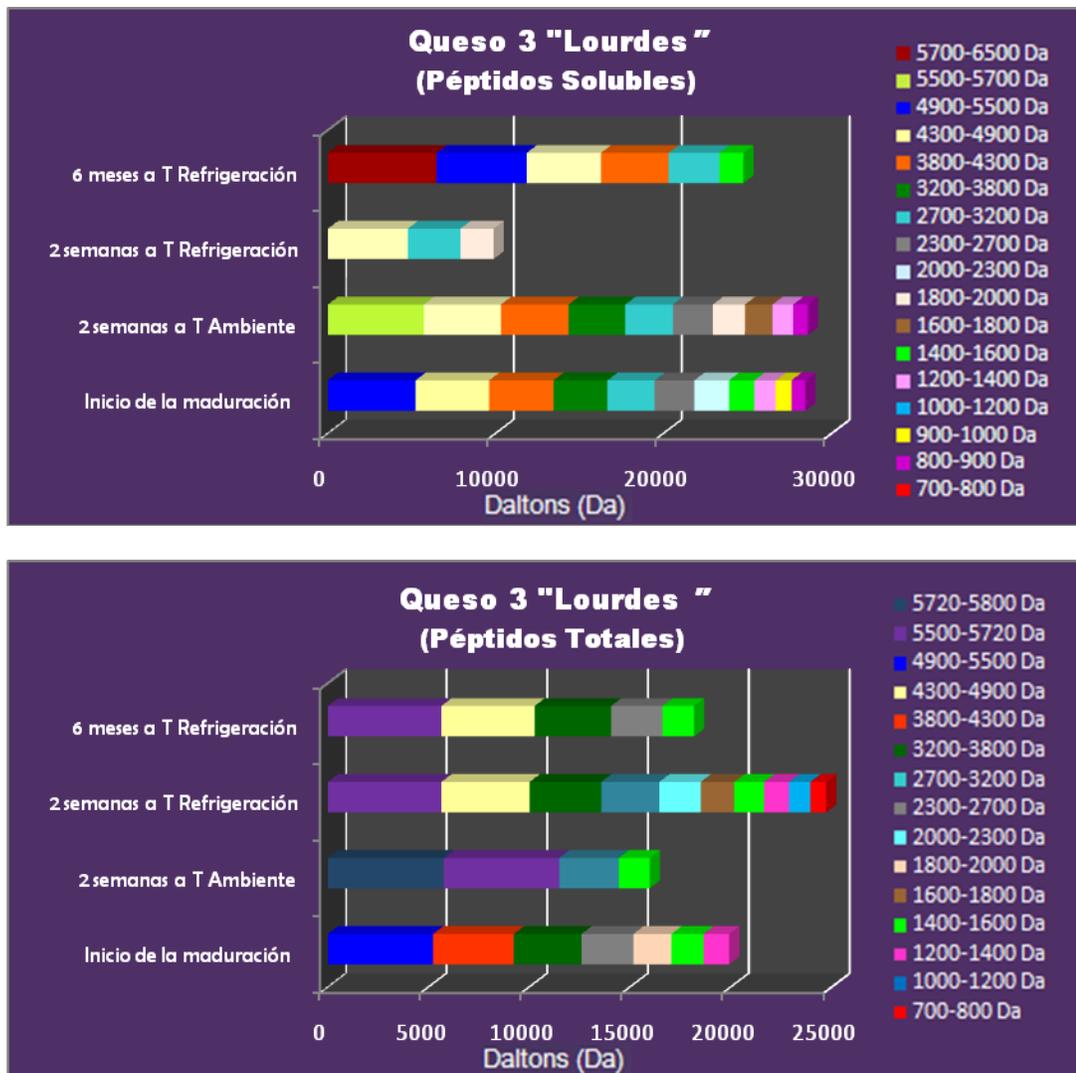
El gráfico 3 muestra que la mayor actividad proteolítica del queso proveniente del Rancho Piedra Amarilla, fue en la parte insoluble de la proteína bajo condiciones de refrigeración por dos semanas, donde se monitorearon 8 péptidos sin embargo, luego de seis meses en estas condiciones, esta cantidad de péptidos se redujo a la mitad (4 péptidos) lo que indica que a determinado tiempo de maduración se dejan de formar ciertos péptidos ó se degradan.

Grafico 3. Péptidos encontrados en Proteína Soluble y Proteína Total en el Queso del Rancho Piedra Amarilla



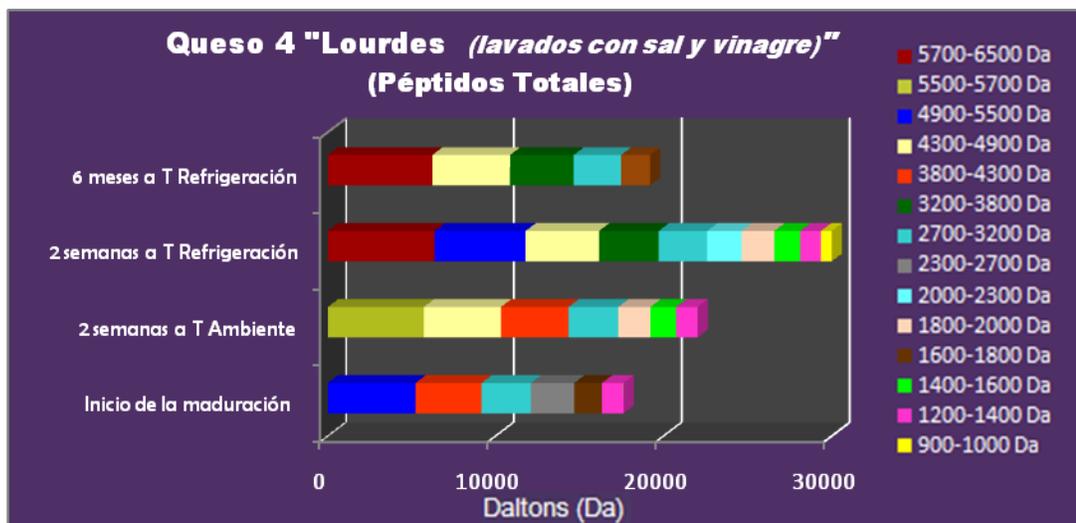
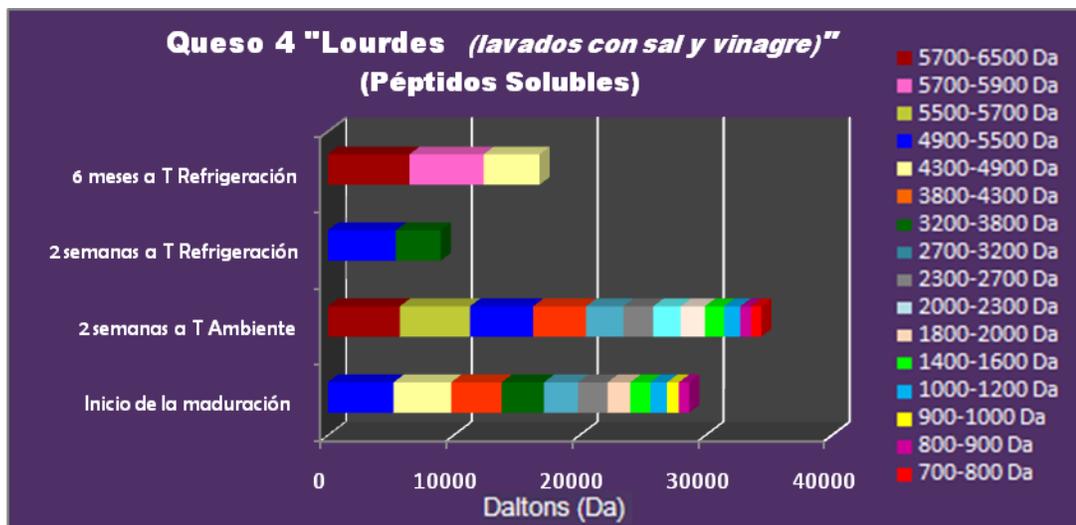
Como se observa en el gráfico 4 la cantidad de péptidos formados en la fracción soluble del queso Lourdes es mayor al inicio de la maduración (11 péptidos) y bajo condiciones de temperatura ambiente (10 péptidos) ; sin embargo en la fracción de proteína total se observó una mayor producción de péptidos (10 péptidos) bajo condiciones de maduración a temperatura de refrigeración durante dos semanas misma que disminuye luego de seis meses donde solo se forman 5 péptidos y ya no se observa la formación de péptidos inferiores a los 1000 Da.

Grafico 4. Péptidos encontrados en Proteína Soluble y Proteína Total en el Queso del Rancho Lourdes



Como se puede observar en el gráfico 5, el queso del Rancho Lourdes con lavados de sal y vinagre, muestra un comportamiento de formación de péptidos similar al del queso "3" proveniente del mismo rancho. Sin embargo, en ambas fracciones de este queso se observó un incremento en la formación de péptidos a temperatura ambiente, en comparación con los péptidos al inicio de la maduración; esto podría deberse a que este queso había sido añejado

Grafico 5. Péptidos encontrados en Proteína Soluble y Proteína Total en el Queso del Rancho Lourdes (lavados con sal y vinagre).



tres meses más que el anterior, por lo que hubo más tiempo para que sucedieran las reacciones hidrolíticas, además de que la microbiota presente que sobrevive a los lavados de sal y vinagre, se vió favorecida en estas condiciones de temperatura. Sin embargo no se debe perder de vista que este tratamiento de sal y vinagre efectuado en quesos elaborados en la misma región pudo ser quizá el factor que generó una variación entre la flora microbiana de ambos quesos, que se ve reflejada en la formación de péptidos diferentes.

VII.3. Relación de péptidos encontrados en los quesos estudiados a diferentes temperaturas de maduración y su concordancia con péptidos bioactivos reportados, con base en el peso molecular determinado.

Las proteínas lácteas contienen algunos péptidos que son inactivos dentro de la secuencia de la proteína intacta, y pueden ser liberados por la acción de diferentes enzimas proteolíticas. Una vez liberados su importancia fisiológica deriva en las siguientes propiedades hasta ahora descritas: acción antihipertensiva (inhibidores de la ECA), transportadores de calcio (caseinofosopeptidos (CCP)), actividad opioide, antitrombóticos y agentes inmunomoduladores.

La determinación de los pesos moleculares de los péptidos encontrados mediante el estudio electroforético al que fueron sometidas las muestras de queso Cotija maduras a diferentes condiciones, permitió efectuar un análisis comparativo entre los péptidos reportados como bioactivos que oscilan entre los 416 a 4807 Da (Dionysius y Milne, 1997) y los péptidos identificados experimentalmente que se cree pueden poseer ciertas secuencias peptídicas bioactivas. De esta manera, se compararon los pesos moleculares de las fracciones peptídicas obtenidas con los pesos moleculares de las secuencias de los péptidos reportados como bioactivos. Debido a que el PM se determinó por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS podría no detectar cambios tan pequeños en el PM, por lo cual se consideran como posibles equivalentes del péptido bioactivo en cuestión a péptidos que difieran del peso de éste en un rango aproximado de ± 55 Da para los péptidos mayores a 1000Da y de ± 20 Da para los péptidos menores a 1000 Da.

Los resultados obtenidos fueron ordenados en las tablas 10 (péptidos solubles) y 11 (péptidos totales) en las cuales se indica el número de queso, condición de maduración (**A**: Inicio de la maduración, **B**: 2 semanas a temperatura ambiente (21 °C), **C**: 2 semanas a temperatura de refrigeración (4°C), **D**: 6 meses a temperatura de refrigeración (4°C)), peso molecular aproximado experimentalmente, peso reportado en la literatura, fragmento, proteína precursora, posible bioactividad y referencias.

Cabe mencionar que el comportamiento en general observado durante este análisis demostró que la temperatura y tiempo de maduración de cada queso, si produce un cambio en el perfil de péptidos del producto ya que se monitoreó la presencia de péptidos diferentes en cada temperatura de maduración experimentada, lo que indica que diferentes microorganismos generaron diferentes péptidos dependiendo las endopeptidasas de cada especie.

De acuerdo al tamaño del peso molecular encontrado en los geles, se cree que los péptidos que se encuentran presentes en mayor proporción en todos los quesos estudiados fueron del tipo caseinofosfopéptidos (o péptidos acarreadores de minerales) los cuales previenen la precipitación del fosfato cálcico en la luz intestinal durante la digestión, (Meisel, 1997). De esta forma incrementan potencialmente la biodisponibilidad de aquél. Además, los caseinofosfopéptidos tienen la capacidad de quelar grandes cantidades de iones polivalentes sin alterar su solubilidad, lo cual los hace vehículos excelentes de los minerales.

VII.3.1. Queso 1 “Cotija Rancho el Lorenzo”

a) Fracción de Péptidos Solubles

Las secuencias peptídicas encontradas en esta fracción proteínica durante las temperaturas de maduración experimentadas oscilaron dentro del rango de 892 Da a 4026 Da y en su mayoría los péptidos encontrados resultaron ser del tipo caseinofosfopéptidos con actividad transportadora de minerales e inmunomoduladora, pero también fueron encontrados en menor cantidad fragmentos peptídicos que coincidían con péptidos antihipertensivos inhibidores de ECA correspondiente al fragmento f1-13, de la secuencia α s1- CN (al inicio de la maduración de PM1536.35; luego de madurar 2 semanas a T ambiente de PM 1909.41 correspondiente al fragmento f 193-209 de la β -CN y luego de madurar 6 meses a T de refrigeración de PM 1251.6 correspondiente al fragmento f25-34 de la secuencia κ - CN) y diferentes péptidos opioides.

Por su parte el estudio de maduración a temperatura ambiente a 21°C, permitió observar un aumento en la cantidad de péptidos, comparado con los determinados al inicio de la maduración, dicho comportamiento obedece a una mayor actividad proteolítica por el aumento en la temperatura que ocasiona una aceleración de las reacciones enzimáticas y microbianas que producen una mayor hidrólisis de las proteínas y generación de péptidos que oscilan de los 4071 Da a 920 Da. Cabe mencionar que un péptido singular que solo se detectó en este estudio fue el *a caseína exomorfin* con peso molecular de 920.73 Da, correspondiente al fragmento f90-96 de la secuencia α_{s1} -CN y reportado por Meisel y Fitzgerald (2003) como péptido opioide.

Durante el estudio de refrigeración, solo se localizó un péptido con peso molecular de 1756 Da del tipo caseinofosofopéptido con posible correspondencia α_{s1} -CN f43-58. Esta disminución en la presencia de péptidos bioactivos, posiblemente se debió a la influencia de la baja temperatura que retrasó las reacciones enzimáticas, suscitando una disminución en la actividad proteolítica que frenó la hidrólisis de las proteínas eludiendo la generación de péptidos de menor tamaño.

En lo que respecta a los péptidos bioactivos generados luego de 6 meses de maduración, se advirtió la presencia del péptido *casoxina c* de peso molecular 1223.77 Da con posible secuencia α_{s1} -CN f 25 -34, que según parece podría contrarrestar el efecto producido por las casomorfinas que afecta la función gastrointestinal inhibiendo el vaciado gástrico y ocasiona una lenta motilidad intestinal del paso del alimento a través del tracto intestinal. Otra observación importante durante este período de estudio, fue la desaparición del péptido bioactivo más pequeño (892 Da de actividad antihipertensiva) que estuvo presente al inicio de la maduración y que a esta temperatura dejó de estar presente, lo que sugiere, que tal vez la bioactividad del queso como sitúa Meisel y col., (1997) es dependiente de la etapa de maduración del queso y comienza a declinar cuando excede cierto nivel de maduración.

b) Fracción de Péptidos Totales

Se observó la presencia de péptidos característicos en cada una de las temperaturas experimentadas, tales como β casokinina-10 al inicio de la maduración, α_{s1} -casokinina a temperatura ambiente, *isracidina* y β casomorфина-11 durante la temperatura de refrigeración y *casoxina c* además de α_{s1} -Casokinina-7 luego de seis meses de maduración a temperatura de refrigeración. Así mismo en esta fracción proteínica fue donde se identificó la mayor cantidad de péptidos con actividad antihipertensiva, para este queso. Este fenómeno obedeció a que durante todas las temperaturas experimentadas se detectaron secuencias peptídicas denominadas casoquininas y las cuales derivaron de los fragmentos a α_{s1} -CN f (23-27) y β -CNf (177-183) además de fragmentos como la *casoxina c* y α_{s1} -Casokinina-7 las cuales funcionan como inhibidoras de la enzima convertidora de angiotensina también conocida como ECA.

Se observó que al igual que en la proteína soluble en las fracciones derivadas de la caseína o proteína total también hubo una disminución de péptidos bioactivos luego de seis meses de maduración. Sin embargo durante el estudio de maduración a temperatura ambiente fue donde se obtuvo una mayor cantidad y variabilidad de péptidos bioactivos que oscilan entre los 3265.13 Da a 856.49 Da.

II.3.2. Queso 2 “Cotija Rancho Piedra Amarilla”

a) Fracción de Péptidos Solubles

Los péptidos encontrados en los hidrolizados de este queso según la literatura, parecen ser de actividad transportadora de minerales, inhibidores de la enzima de convertidora de la angiotensina (ECA) y de actividad opiácea, los cuales, seguramente fueron producidos por diferentes microorganismos.

Un péptido característico que fue localizado únicamente al inicio de la maduración fue la llamada “casoxina a”, la cual es identificada en la literatura como un péptido de actividad

opioide antagonista (procedente de κ -caseína) que al parecer podría que contrarrestar el efecto de alentar la motilidad gástrica inducida por las casomorfinas.

Cabe resaltar que este queso proveniente del rancho Piedra Amarilla fue el que menor cantidad de péptidos bioactivos presentó, lo cual posibilita la creencia de que existan diferentes tipos de microorganismos entre muestras y por ende una producción distinta de este queso en cuanto la cantidad de péptidos detectados en comparación con los otros quesos analizados. Sin embargo, fue definitivamente al inicio de la maduración donde este producto exhibió la mayor cantidad de secuencias bioactivas con péptidos que oscilaron entre los 975.21 a 3213.66 Da, ya que se observó que los péptidos bioactivos disminuyeron a causa de la maduración a la que fue sometida el queso por dos semanas a temperatura de refrigeración a 4 °C. Si bien las secuencias bioactivas no desaparecieron por completo, sí se observó solo la formación de un péptido nuevo de tamaño intermedio (1669.55 Da), en tanto que luego de madurar seis meses en las mismas condiciones, sólo se distinguieron dos péptidos que oscilaron entre los 1711.2 a 3026.91 Da y desaparecieron los péptidos que coincidían con una posible actividad inhibitoria de ECA. Este comportamiento pone de manifiesto que a un mayor tiempo de maduración, el fenómeno reportado por Gasson y De Vos en 1994, conocido como la formación escalonada de péptidos se ve afectado y por ello tal vez la bioactividad del queso, como indica Meisel et al (1997), comienza a declinar.

b) Fracción de Péptidos Totales

Al inicio de la maduración solo se localizó un péptido con un peso molecular de 1249.97 Da identificado como “casoxina C” derivado del fragmento 25-34 y con actividad antagonista opioide e inhibidor de ECA (Meisel et al, 1997). Sin embargo un fenómeno observado en este queso como en las otras muestras analizadas, fue que aún durante la temperatura de refrigeración a 4°C, hubo un incremento en la producción de secuencias bioactivas. Esto pudo deberse en gran medida a que las condiciones de refrigeración favorecieron y permitieron que las endopeptidasas de las bacterias continúen la proteólisis de proteínas insolubles de mayor peso molecular (Nighswonger y col 1996).

Al comparar los patrones electroforéticos de los hidrolizados de seis meses a temperatura de refrigeración y los que solo fueron refrigerados por solo dos semanas, se observó que en el primero de los casos se detectó la formación de 3 péptidos con un peso molecular de 2312.06 Da, 1156.38 Da y 1276.44 Da, en comparación con el segundo caso donde solo se refrigeraron por dos semanas y se observaron 4 péptidos con pesos moleculares de: 2058.73 Da, 1669.55 Da, 1193.71 Da y 853.49 Da, donde incluso se mostraba una formación más escalonada y con presencia de péptidos de menor peso molecular; el resultado de esta comparación indica nuevamente que a determinado tiempo de maduración se dejan de producir ciertos péptidos.

Un dato relevante que solo se observó en este queso, fue que el péptido identificado al inicio de la maduración como “casoxina C”, continuó presente luego del estudio de seis meses a temperatura de refrigeración, hecho que nos indica la especificidad de una enzima presente en este queso para producir el mismo fragmento aún bajo un largo lapso de refrigeración.

No obstante debido a que además se presentaron péptidos característicos, luego de someter al queso a los estudios de maduración a temperatura de refrigeración por dos semanas y seis meses, los cuales fueron identificados como β -casomorfina-11 correspondiente al f 60-70 procedente de β -CN con un peso de 1193.71 Da y posible actividad agonista opioide o inmunomodulador, en el primer estudio y β -casoquinina-10 correspondiente al f 193-202 procedente de β -CN de 1156.38 Da y posible actividad agonista opioide o antihipertensivo en el segundo estudio; podríamos decir que este último péptido pudo ser el resultado de la hidrólisis del primero.

VII.3.3. Queso 3 “Cotija Rancho el Lourdes”

a) Fracción de Péptidos Solubles

Cabe hacer mención que de los cuatro quesos analizados este queso proveniente del Rancho Lourdes fue donde se localizaron una mayor cantidad de péptidos bioactivos tanto en la

fracción soluble como en la fracción de proteína total. Y de hecho aunque en todas las cinéticas experimentadas existió una gran variabilidad de péptidos, las etapas donde se identificaron un mayor número de péptidos con posible función biológica, fueron: 1) al inicio de la maduración, donde se contemplaron ocho péptidos bioactivos que oscilaron entre los 817.33 a 3213.66 Da, de los cuales cinco parecen tener una posible actividad antihipertensiva; y 2) después de la cinética de maduración por dos semanas a 21°C, en la cual los péptidos localizados oscilaron entre los 793.96 a 2960.74 Da y donde de hecho se monitorearon los péptidos con menor pesos molecular de entre todos los quesos analizados.

Así mismo, dada la variabilidad en los péptidos encontrados, se dedujo que este queso a diferencia de los otros, posiblemente presentaba una mayor diversidad en su flora microbiológica que ocasionó una degradación más variante en las proteínas, dependiendo la actividad proteolítica de cada microorganismo presente. Pero además se advierte la posibilidad de que la situación geográfica del rancho de producción del queso está ligada a la influencia en la formación de compuestos bioactivos.

Cabe hacer presente que durante el estudio de refrigeración por dos semanas a 4°C, se observó el retraso esperado en la actividad proteolítica, por efecto de la baja temperatura que ocasionó la disminución en la cantidad de péptidos formados en este período.

En tanto a los resultados obtenidos al término de la maduración por seis meses a temperatura de refrigeración a 4 °C, comparados con los resultados al inicio de la maduración, mostraron la presencia de péptidos del tipo caseinofosfopéptidos con actividad transportadora de minerales y se continuó visualizando, la clara desaparición de péptidos de bajo peso molecular (inferiores a 1400 Da) lo cual continuó indicando, que con el paso del tiempo algunos péptidos ya no se encuentran presentes debido a que algunas bacterias presentes en el queso, no logran sobrevivir a estas condiciones de almacenamiento (Nighswonger y col., 1996), ó bien los microorganismos presentes consumen la misma proteína con lo cual desaparecen dichos péptidos ó tal vez se pierden péptidos por la deshidratación del mismo queso.

b) Fracción de Péptidos Totales

En la fracción de péptidos totales de este queso se observó que los péptidos encontrados al inicio de la maduración y que resultaron coincidentes con los péptidos bioactivos reportados en la literatura, fueron de entre el peso molecular de los 1270.57 a 3358.15 Da y de posible bioactividad antihipertensiva y transportadora de minerales; aunque también se encontró al menos un péptido que por su peso molecular de 1270.57 Da, pudiera ser casoplatelina con actividad antitrombótica y antimicrobiana de posible procedencia de κ -CN el cual además se encontró presente tanto en la fracción de péptidos solubles como en la de los péptidos totales.

En lo que respecta al estudio a temperatura ambiente por dos semanas a 21 °C, se observó que la proteólisis no fue tan notoria como influencia de la temperatura en comparación con la efectuada en la fracción de péptidos solubles, donde si hubo producción de péptidos inferiores a 1000 Da. Sin embargo algo característico de esta etapa de maduración fue la formación del péptido α_1 -casoquinina-7 de peso molecular 1286.47 Da con actividad inhibitoria de ECA y la cual también estuvo presente en ambas fracciones proteínicas.

Durante la temperatura de refrigeración por dos semanas a 4°C y debido a la presencia de un mayor número de péptidos, se advirtió que la proteólisis en la fracción proteína total continuó aún durante su refrigeración y quizás esto pueda ser el resultado de que la leche con la que se elaboró el producto tenga un alto contenido de bacterias psicrótrofas ó microorganismos que secretaron proteasas exógenas resistentes al calor y actuaron durante el almacenamiento en frío (Rangel, 2003).

Los resultados del estudio de maduración luego de los seis meses de almacenamiento a 4 °C, muestran una reducción del 50 % de los péptidos con posible actividad biológica, en relación con los encontrados al inicio de la maduración. Este comportamiento tal vez pueda ser el resultado de la degradación total de algunos compuestos que van dejando de estar presentes y que inhiben la formación de otros, o bien puede que simplemente sea debido a la disminución

de algunas bacterias que dejan de estar presentes conforme avanza la maduración ocasionando que se pierda actividad proteínica.

VII.3.4. Queso 4 “Cotija del Rancho el Lourdes” (lavado con sal y vinagre cada mes durante los primeros 3 meses a su elaboración)

a) Fracción de Péptidos Solubles

Lo característico del estudio de este queso a diferentes temperatura, fue el hecho que tanto al inicio de su maduración, como después del estudio de maduración a 21°C, se observó la presencia de péptidos bioactivos cuyos pesos moleculares variaron con el tiempo, habiendo secuencias con pesos mayores (4000 a 3350 Da), intermedios (1000 a 2000 Da) y pequeños (< 1000 Da) demostrando claramente la formación escalonada de péptidos (Gasson y De Vos en 1994).

Sin embargo fue claro que para este queso la maduración a temperatura de refrigeración a 4° C, no resultó nada favorable para la formación de compuestos bioactivos ya que según lo observado los péptidos biológicamente activos desaparecieron de la fracción de proteína soluble luego de ser expuestos a 4 °C, tanto en el caso de la cinética experimentada por dos semanas, como en la de cinética de seis meses. Este efecto puede estar relacionado con el proceso de elaboración de esta muestra ya que como ya se mencionó anteriormente este queso en especial es lavado cada mes con sal y vinagre ocasionando una disminución en la actividad acuosa y reduciendo el número de microorganismos presentes. De ahí que probablemente bacterias lácticas que tienen la viabilidad de crecer en almacenamiento durante su refrigeración a 4 °C, como *Lactobacillus acidophillus* y *Streptococcus thermophilus* (Nighswonger y col., 1996) hayan sido inhibidas y por ende la producción proceso proteolítico de péptidos bioactivos se vió limitada.

Los pesos moleculares de los péptidos encontrados en la fracción del suero de este queso, coincidieron, al igual que las otras muestras analizadas ya que también presentaron péptidos del tipo caseinofosfopéptidos, aunque también se identificaron algunos que podrían provenir de la β -CN y con posible actividad inhibidora de ECA.

b) Fracción de Péptidos Totales

Al inicio de la maduración se identificaron tres péptidos que podrían tener actividad biológica, en tanto que en el estudio de maduración a 21 °C solo se identificaron dos; sin embargo dado que en la temperatura de maduración a 4 °C se identificaron cuatro péptidos con posible actividad biológica, se deduce que a temperatura de refrigeración se favorecen las reacciones enzimáticas y microbiológicas en esta fracción del queso que degradaron las proteínas alentando la formación de péptidos bioactivos.

La gran mayoría de los péptidos encontrados en la fracción de péptidos totales de este queso proveniente del Rancho Lourdes, coincidieron con el peso molecular de péptidos bioactivos que presentan una acción ligadora de minerales, pero también fueron encontrados en menor cantidad, fragmentos peptídicos que coincidían con péptidos antihipertensivos, opioides, antitrombóticos y antimicrobianos. Y dado que los péptidos con posible función antihipertensiva se formaron durante el estudio de refrigeración, se deduce que tal vez las bacterias y enzimas que hidrolizan estos péptidos sean más activas a esta temperatura debido a que provienen de una zona de producción más fría y por ello solo se observaron bajo estas condiciones experimentales.

Cabe mencionar que el efecto de una larga maduración del queso en condiciones de refrigeración, el cual ocasiona que se dejen de producir ciertos péptidos bioactivos, continuó observándose en esta muestra, ya que luego de seis meses a temperatura de refrigeración a 4 °C, solo se encontraron dos péptidos con posible actividad biológica en comparación con el inicial donde se encontraron tres.

Tabla 10. Comparativo en base al pesos moleculares determinado de los péptidos solubles localizados a diferentes condiciones de temperatura y tiempo experimentados en el presente estudio vs. los péptidos bioactivos reportados en la literatura.

Peptidos Solubles								
Condición maduración al que fue localizado el péptido	No. de Queso	Peso Molecular aproximado encontrado (Da)	Peso Molecular reportado (Da)	Posible Péptido	Fragmento	Proteína precursora	Posible Bioactividad	Referencia
C	3	4764.31	4773		f 165-203	α_{s1} - CN	Antimicrobiano	
D	3	4026.24	4071.5	Caseinofosfopéptido	f43-79	α_{s1} - CN	Transportador de Minerales	Shan 2000 Harsharnjit y col. 2000
B	1							
C	4							
C	4	3377.54	3332.5			β - CN	Antihipertensivo	Eryck y col. 2003
A	4	3358.15	3332.5			β - CN	Antihipertensivo	Eryck y col. 2003
A	2,3	3213.66	3221.6			β - CN	Antihipertensivo	Eryck y col. 2003
C	3	3131.84	3126	Lactoferricina B	f17-41	Lactoferrina	Inmunomodulador Antimicrobiano	Clare y Swaisgood 2000 Rokka y col. 1997
D	2,3	3026.91	3002.5	Caseinofosfopéptido	f 2-28	β - CN	Transportador de Minerales	Silva y Malcata 2005 Smacchi y Gobetti 2000
B	1,3	2960.74	3002.5	Caseinofosfopéptido	f 2-28	β - CN	Transportador de Minerales	Smacchi y Gobetti 2000 Silva y Malcata 2005
C	4	2834	2811	Caseinofosfopéptido		α_{s1} - CN	Antihipertensivo	Harsharnjit y col. 2000
A	3	2814.49						
A	1,4	2639.39	2688.8	Caseinofosfopéptido	f 46-70	α_{s2} - CN	Transportador de Minerales	Smacchi y Gobetti 2000
			2607.8	Caseinofosfopéptido	f 1-21	α_{s2} - CN	Transportador de Minerales	Smacchi y Gobetti 2000
D	1	2620.59	2607.8	Caseinofosfopéptido	f 1-21	α_{s2} - CN	Transportador de Minerales	Smacchi y Gobetti 2000
B	1,3	2378.48	2357	Caseinofosfopéptido	f 64-84	α_{s2} - CN	Transportador de Minerales Inmunomodulador	
C	4							
A	3,4	2358.3	2357	Caseinofosfopéptido	f 64-84	α_{s1} - CN	Transportador de Minerales Inmunomodulador	Smacchi y Gobetti 2000
A	2	2256.83	2248.7			β - CN	Antihipertensivo	Eryck y col. 2003
B	3	2178.21	2182.3	Caseinofosfopéptido	f 55-75	α_{s2} - CN	Transportador de Minerales	Silva y Malcata 2005
A	3	2066.33	2034			β - CN	Antihipertensivo	
C	3	1974.24	2034			β - CN	Antihipertensivo	

Simbología:

Condición de Maduración	Número de Queso y Origen
A: Inicio de la Maduración	Queso No. 1 Rancho El Lorenzo
B: 2 Semanas a Temperatura Ambiente (21°C)	Queso No. 2 Rancho Piedra Amarilla
C: 2 Semanas a Temperatura de Refrigeración (4° C)	Queso No. 3 del Rancho Lourdes
D: 6 Meses a Temperatura de Refrigeración (4°C)	Queso No. 4 Rancho Lourdes con lavados de sal y vinagre

Peptidos Solubles (Segunda Parte)								
Condición maduración al que fue localizado el péptido	No. de Queso	Peso Molecular aproximado encontrado (Da)	Peso Molecular reportado (Da)	Posible Péptido	Fragmento	Proteína precursora	Posible Bioactividad	Referencia
B	1,3	1909.41	1881.3		f 193-209	β - CN	Antimicrobiano Inmunomodulador Antihipertensivo	Harsharnjit y col. 2000 Rokka y col. 1997 Eryck y col. 2003
C	4	1909.41						
A	4	1809.25	1809			β - CN	Antihipertensivo	Eryck y col. 2003
C	1	1741	1756	Caseinofosfopéptido	f 43-58	α_{s1} - CN	Transportador de Minerales Absorción mineral Absorción de calcio	
D	2	1711.2	1756	Caseinofosfopéptido	f 43-58	α_{s1} - CN	Transportador de Minerales Absorción de calcio	
C	2	1669.55	1656			β - CN	Antihipertensivo	Eryck y col. 2003
C	4	1642.86	1639	β -casomorfina-7	f58-72	β - CN	Antihipertensivo	Smacchi y Gobbetti 2000
A	4	1584.89	1551.9	Caseinofosfopéptido	f15-28		Transportador de Minerales Inmunomodulador	
B	3	1533.2	1536		f1-13	α_{s1} - CN	Antihipertensivo	Saito y col. 2000
A	1,3	1516.35	1536		f1-13	α_{s1} - CN	Antihipertensivo	Saito y col. 2000
			1551.9	Caseinofosfopéptido	f15-28		Transportador de Minerales Inmunomodulador	
			1536		f1-13	α_{s1} - CN	Antihipertensivo	Saito y col. 2000
B	1	1444.77	1429	Caseinofosfopéptido	f6-18	α_{s2} - CN	Transportador de Minerales Inmunomodulador	Clare y Swaisgood 2000
D	3	1414.49	1417.6	Caseinofosfopéptido		α_{s2} - CN	Transportador de Minerales	Smacchi y Gobbetti 2000 Clare y Swaisgood 2000
A	2	1388.03	1386.5	Caseinofosfopéptido	f 138-149	α_{s2} - CN	Transportador de Minerales	Smacchi y Gobbetti 2000
C	4	1231.12	1230.4	Caseinofosfopéptido	f7-18	β - CN	TM Inmunomodulador	Clare y Swaisgood 2000 Smacchi y Gobbetti 2000
A	4	1328.31	1333.6		f109-119	β - CN	Antihipertensivo	Saito y col. 2000
B	3	1286.47	1292.5	α_{s1} -Casokinina-7	f 28-38	α_{s1} - CN	Antihipertensivo	Eryck y col. 2003
A	3	1270.57	1271	Casoplatelina	f 106-116	κ - CN	Antitrombótico Antimicrobiano	Meisel 1999 Silva y Malcata 2005
D	1	1223.77	1234	Caseinofosfopéptido	f7-18	β - CN	Transportador de Minerales Inmunomodulador	Meisel 1999
			1251.6	Casoxina C	f 25-34	κ - CN	Antagonista opiode Antihipertensivo	
A	2	975.21	975	Casoxina A		κ - CN	Antagonista Opiode	
A	3,4	932.82	920	a caseina exorfina	90-96	α_{s1} - CN	Péptidos Opioides	
			947			β - CN	Antihipertensivo	
B	1	905.73	920	a caseina exorfina	90-96	α_{s1} - CN	Péptidos Opioides	
A	1	892.69	867		f157-164	α_{s1} - CN	Antihipertensivo	
B	3	866.76	867		157-164	α_{s1} - CN	Antihipertensivo	
C	4							
A	3,4	817.33	818		35-41	κ - CN	Péptidos Opioides	
B	3	793.96	771		f33-38	κ - CN	Antagonista Opiode	

Simbología:

Condición de Maduración	Número de Queso y Origen
A: Inicio de la Maduración	Queso No. 1 Rancho El Lorenzo
B: 2 Semanas a Temperatura Ambiente (21°C)	Queso No. 2 Rancho Piedra Amarilla
C: 2 Semanas a Temperatura de Refrigeración (4° C)	Queso No. 3 del Rancho Lourdes
D: 6 Meses a Temperatura de Refrigeración (4°C)	Queso No. 4 Rancho Lourdes con lavados de sal y vinagre

Tabla 11. Comparativo en base al pesos moleculares determinado de los péptidos totales localizados a diferentes condiciones de temperatura y tiempo experimentados en el presente estudio vs. los péptidos bioactivos reportados en la literatura.

Peptidos Totales								
Condición maduración al que fue localizado el péptido	No. de Queso	Peso Molecular aproximado encontrado (Da)	Peso Molecular reportado (Da)	Possible Péptido	Fragmento	Proteína precursora	Possible Bioactividad	Referencia
B	3	4026.24	4071.5	Caseínofosfopéptido	f43-79	α_{s1} -CN	Transportador de Minerales	Harsharnjit y col. 2000
A	3	3358.15	3332.5			β -CN	Antihipertensivo	Eryck y col. 2003
C	1	3265.13	3257			α_{s2} -CN	Antihipertensivo	
B	3	2960.74	3002.5	Caseínofosfopéptido	f 2-28	β -CN	Transportador de Minerales	Meisel 1999 Smacchi y Gobetti 2000
C	4							
D	1,4	2819.68	2803.2	Caseínofosfopéptido α -Caseínofosfato	f 1-25	β -CN	Absorción mineral Transportador de Minerales Absorción de calcio Antihipertensivo	Smacchi y Gobetti 2000 Eryck y col. 2003 Harsharnjit y col. 2000 Meisel 1999
			2811	Caseínofosfopéptido		α_{s1} -CN	Antihipertensivo	
C	1	2761.85	2764	Isracidina	f1-23	α_{s1} -CN	Antimicrobiano, Inmunomodulador	Silva y Malcata 2005 Clare y Swaisgood 2000
D	3	2553.88	2574		f 1-21	α_{s1} -CN	Transportador de Minerales	
A	4	2576.32	2607.8	Caseínofosfopéptido	f 1-21	α_{s2} -CN	Transportador de Minerales	Smacchi y Gobetti 2000
C	1	2335.61	2321.5	Caseínofosfopéptido α_1 1- Caseínofosfato	f 59-79	α_{s1} -CN	Transportador de Minerales Absorción de Calcio	Meisel 1999 Clare y Swaisgood 2000
			2340.7	Caseínofosfopéptido	f 64-84	α_{s1} -CN	Transportador de Minerales	Smacchi y Gobetti 2000 Clare y Swaisgood 2000
D	1,2	2312.06	2321.5	Caseínofosfopéptido α_1 1-Caseínofosfato	f 59-79	α_{s1} -CN	Transportador de Minerales Absorción de Calcio	Smacchi y Gobetti 2000 Clare y Swaisgood 2000 Meisel 1999
			2340.7	Caseínofosfopéptido	f 64-84	α_{s1} -CN	Transportador de Minerales	Smacchi y Gobetti 2000 Clare y Swaisgood 2000
B	1	2276.14	2248.7			β -CN	Antihipertensivo	Eryck y col. 2003
			2287.6	Caseínofosfopéptido	f 2-21	α_{s2} -CN	Transportador de Minerales	Smacchi y Gobetti 2000
A	1	2256.83	2248.7			β -CN	Antihipertensivo	Eryck y col., 2003
C	1	2147.34	2158	Caseínofosfopéptido	58-77	β -CN	Precursor de β -casomorfina	
C	2,3	2058.73	2034			β -CN	Antihipertensivo	
			2095		f 164-179	β -CN	Antimicrobiano	

Simbología:

Condición de Maduración	Número de Queso y Origen
A: Inicio de la Maduración	Queso No. 1 Rancho El Lorenzo
B: 2 Semanas a Temperatura Ambiente (21°C)	Queso No. 2 Rancho Piedra Amarilla
C: 2 Semanas a Temperatura de Refrigeración (4° C)	Queso No. 3 del Rancho Lourdes
D: 6 Meses a Temperatura de Refrigeración (4°C)	Queso No. 4 Rancho Lourdes con lavados de sal y vinagre

Peptidos Totales (Segunda Parte)								
Condición de maduración al que fue localizado el péptido	No. de Queso	Peso Molecular aproximado encontrado (Da)	Peso Molecular reportado (Da)	Possible Péptido	Fragmento	Proteína precursora	Posible Bioactividad	Referencia
B	3	1909.41	1881.3		f 193-209	β - CN	Antimicrobiano Inmunomodulador Antihipertensivo	Silva y Malcata 2005 Rokka y col. 1997
A	1,3	1891.47	1881.3		f 193-209	β - CN	Antimicrobiano Inmunomodulador Antihipertensivo	Silva y Malcata 2005 Eryck y col. 2003 Rokka y col. 1997
B	1	1827.68	1810			β - CN	Antihipertensivo	Eryck y col. 2003
A	1	1731.41	1756	Caseinofosfopéptido	f 43-58	α_{s1} - CN	Transportador de Minerales Absorción mineral Absorción de calcio	
D	4	1718.3	1756	Caseinofosfopéptido	f 43-58	α_{s1} - CN	Transportador de Minerales Absorción mineral Absorción de calcio	
C	1,2,3	1669.55	1656			β - CN	Antihipertensivo	Eryck y col. 2003
A	4	1656.53	1656			β - CN	Antihipertensivo	Eryck y col. 2003
A	3	1584.89	1536		f1-13	α_{s1} - CN	Antihipertensivo	Saito y col. 2000
D	1,3	1556.68	1536		f1-13	α_{s1} - CN	Antihipertensivo	Saito y col. 2000
D	1,3	1556.68	1551.9	Caseinofosfopéptido	F15-28		Transportador de Minerales Inmunomodulador	
B	3	1533.2	1536		f1-13	α_{s1} - CN	Antihipertensivo	Saito y col. 2000
C	4							
C	3	1472.31	1429	Caseinofosfopéptido	f6-18	α_{s2} - CN	Transportador de Minerales Inmunomodulador	Smacchi y Gobbetri 2000 Clare y Swaisgood 2000
A	1	1388.03	1386.5	Caseinofosfopéptido	f 138-149	α_{s2} - CN	Transportador de Minerales	Smacchi y Gobbetri 2000
B	1	1344	1333.6		f109-119	β - CN	Antihipertensivo	Saito y col. 2000
B	3		1384.7	α_{s1} -casokinina	f 23-34	α_{s1} - CN	Antihipertensivo	Meisel 1999
B	3	1286.47	1292.5	α_{s1} -Casokinina-7	f 28-38	α_{s1} - CN	Antihipertensivo	Eryck y col. 2003
D	1,2	1276.44	1251.6	Casoxina C	f 25-34	κ - CN	Antagonista opioide Antihipertensivo	Meisel 1999 Rokka y col. 1997
D	1,2		1271	Casoplatelina	f 106-116	κ - CN	Antitrombótico,	Meisel 1999
D	1,2		1292.5	α_{s1} -Casokinina-7	f 28-38	α_{s1} - CN	Antihipertensivo	Eryck y col. 2003
A	3,4	1270.57	1271	Casoplatelina	f 106-116	κ - CN	Antitrombótico Antimicrobiano	Meisel 1999 Silva y Malcata 2005
A	2	1249.97	1251.6	Casoxina C	f 25-34	κ - CN	Antagonista opioide Antihipertensivo	Meisel 1999 Harsharnjit y col. 2000 Schanbacher y col. 1997
C	3	1244.8	1251.3	Caseinofosfopéptido	f 126-136	α_{s2} - CN	Transportador de Minerales	Smacchi y Gobbetri 2000
C	1, 2	1193.71	1183.2	Caseinofosfopéptido	f 45-55	α_{s1} - CN	Transportador de Minerales	Silva y Malcata 2005 Smacchi y Gobbetri 2000
C	1, 2		1198	β -casomorfina-11	f60-70a	β - CN	Agonista Opiode Inmunomodulador	
D	2	1156.38	1156.3	β -casokinina-10	f 193-202	β - CN	Antihipertensivo	Meisel 1999 Harsharnjit y col. 2000
A	1	1113.27	1156.3	β -casokinina-10	f 193-202	β - CN	Antihipertensivo Inmunomodulador	Meisel 1999
C	3	1052.69	1065		f1-9	α_{s1} - CN variante genética tipob-8p	Antihipertensivo	
C	1,2	853.49	842		142-148	Lactoalbumina	Antihipertensivo	
C	1,2		867			157-164	α_{s1} - CN	Antihipertensivo
C	3	784.69	771		f33-38	κ - CN	Antagonista Opiode	

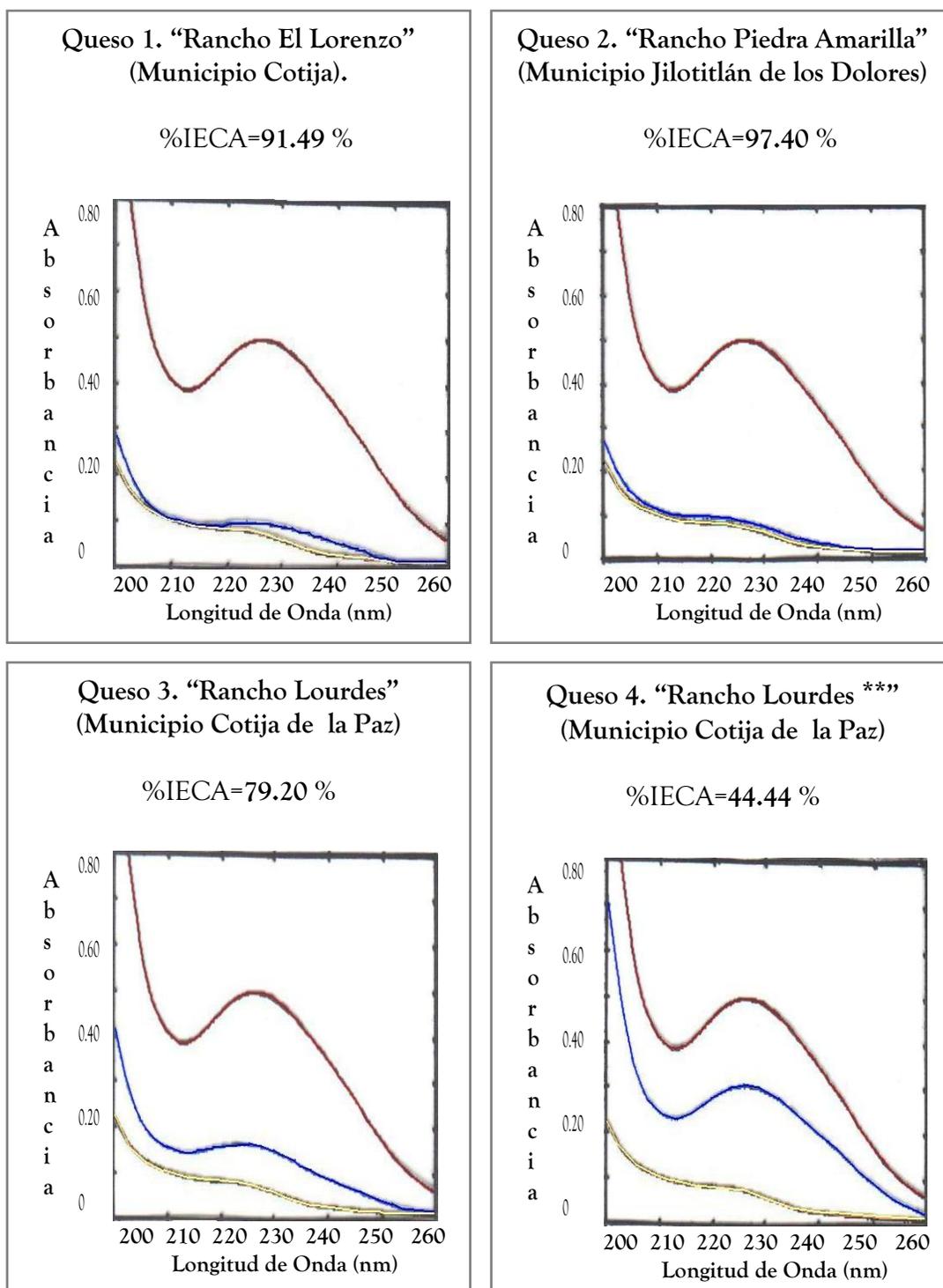
Simbología:

Condición de Maduración	Número de Queso y Origen
A: Inicio de la Maduración	Queso No. 1 Rancho El Lorenzo
B: 2 Semanas a Temperatura Ambiente (21°C)	Queso No. 2 Rancho Piedra Amarilla
C: 2 Semanas a Temperatura de Refrigeración (4° C)	Queso No. 3 del Rancho Lourdes
D: 6 Meses a Temperatura de Refrigeración (4°C)	Queso No. 4 Rancho Lourdes con lavados de sal y vinagre

VII.4. Determinación de la Actividad inhibitoria de la ECA en los auténticos quesos Cotija madurados por 6 meses a temperatura de refrigeración (4 °C).

Los gráficos 6 y 7 muestran los espectros de absorbancia del efecto antihipertensivo de los cuatro quesos Cotija madurados durante 6 meses a 4 °C que fueron usados en el estudio. En todas las muestras se observó una disminución de la absorbancia del ácido hipúrico liberado en la reacción medido a 230 nm, como efecto de la inhibición de la ECA que generaron los péptidos presentes en los extractos de proteína. Sin embargo el efecto inhibitor fue mayor en la fracción de proteína soluble lo cual dictaminó a esta fracción como la de mayor contenido de péptidos inhibidores de ECA.

Gráfico 6. Espectros de Absorbancia del efecto inhibitor de los extractos de proteína soluble de los auténticos quesos Cotija, en la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) medido como el índice de hidrólisis del Hipuril-L-Histidil-L-Leucina.



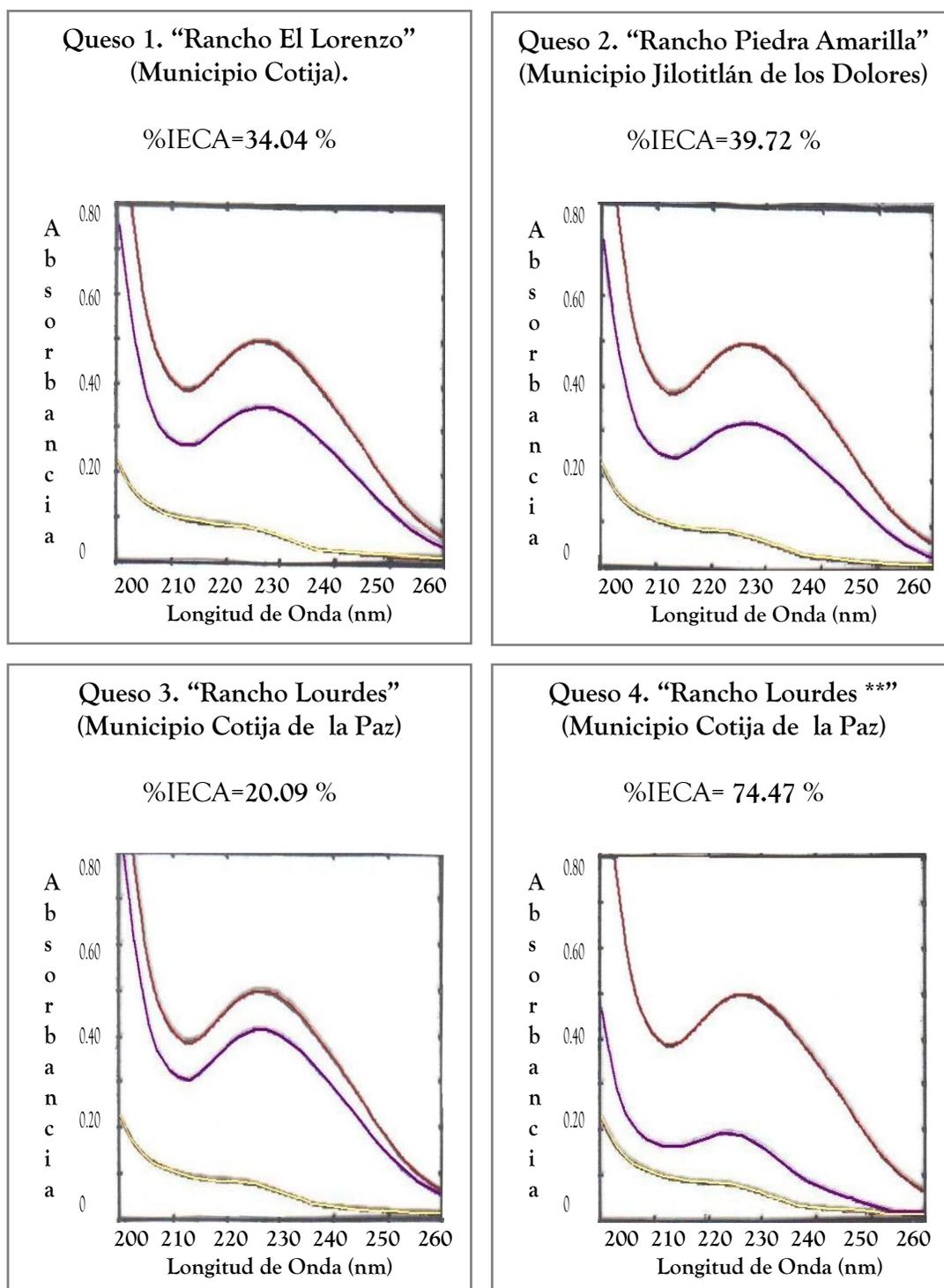
**Lavado con sal y vinagre en los 3 primeros meses de su elaboración.

— Absorbancia del ácido hipúrico formado tras la acción de la ECA sin inhibidor (100% Actividad de la ECA.

— Absorbancia del Hipuril-L-Histidil-L-Leucina sin reaccionar (0% de Actividad de la ECA.)

— Absorbancia del ácido hipúrico formado tras la acción de la ECA en presencia de sustancias de los extractos de proteína soluble de los quesos.

Grafico 7. Espectros de Absorbancia del efecto inhibitor que causan los extractos de proteína total de los auténticos quesos Cotija en la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) medido como el índice de hidrólisis del Hipuril-L-Histidil-L-Leucina.



**Lavado con sal y vinagre en los 3 primeros meses de su elaboración.

— Absorbancia del ácido hipúrico formado tras la acción de la ECA sin inhibidor (100% Actividad de la ECA).

— Absorbancia del Hipuril-L-Histidil-L-Leucina sin reaccionar (0% de Actividad de la ECA.)

— Absorbancia del ácido hipúrico formado tras la acción de la ECA en presencia de sustancias de los extractos de proteína total de los quesos.

En la Tabla 12 se muestran una recopilación de los porcentajes de inhibición de la ECA (%IECA) presentes en los distintos tipos de quesos analizados. Según los resultados obtenidos de la fracción de proteína total, las muestras Q1, Q2, Q3 presentaron porcentajes de inhibición de la ECA relativamente bajos (inferiores al 40%), lo cual sugiere que los microorganismos de estos quesos, no pudieron producir las proteínas derivadas de la proteína total con tanta facilidad como las del suero y por lo tanto no se liberaron péptidos inhibidores de la ECA. Sin embargo no se descarta la posibilidad de que este efecto sea provocado por el efecto de dilución al que las muestras son sometidas para ser analizadas y que obviamente disminuye su concentración disminuyendo la posibilidad de observar un porcentaje de actividad mayor al observado.

Tabla 12. Actividad inhibitoria de la ECA (%) en extractos de proteína soluble y total de los quesos Cotija madurados a temperatura de refrigeración (4 °C) por 6 meses.

MUESTRA	IECA PROTEINA SOLUBLE (%)	IECA PROTEINA TOTAL (%)
Q1. Rancho El Lorenzo	91.49	34.04
Q2. Rancho Piedra Amarilla	97.40	39.72
Q3. Rancho Lourdes	79.20	20.09
Q4. Rancho Lourdes <i>**Lavado con sal y vinagre una vez al mes durante los 3 primeros meses de su elaboración.</i>	44.44	74.47

Los porcentajes de inhibición de la ECA determinados en los extractos de proteína soluble de los quesos Q1, Q2 y Q3 fueron del 91.49, 97.40, al 79.20%, respectivamente. Estos resultados fueron superiores al 70% descrito por Meisel y col., (1997) para el queso Gouda madurado durante 8 meses. Pero además estos datos permiten aseverar que existe una gran probabilidad de que los péptidos con mayor actividad antihipertensiva, se localizan en la parte de proteína soluble y no en la proteína total, a

excepción claro, del queso del Rancho Lourdes (Q4) donde probablemente, la acción del cuajo sumada a la acción de los microorganismos capaces de sobrevivir a los lavados de sal y vinagre que se realizaron mes con mes, durante los tres primeros meses a su elaboración, permitieron la liberación de aminoácidos que conformaron péptidos de elevada actividad inhibitoria de la ECA.

Analizando la diferencia entre los porcentajes de inhibición obtenidos para cada muestra, cabe mencionar que el tipo de microbiota local y las condiciones del proceso de maduración son factores que pudieron influir en la producción de péptidos inhibidores de la ECA en cada queso. Esto se debe a que factores como la variación de temperatura entre las diferentes zonas de producción de queso Cotija, ocasionan que se genere un perfil peptídico diferente como consecuencia de la hidrólisis realizada por sistemas proteolíticos de diferentes microorganismos que caracterizan la región donde fue elaborado y madurado cada producto.

Debido a que en cada queso se encontraron diferentes secuencias peptídicas, es muy posible que en las muestras Q1 y Q2 donde se encontraron porcentajes de inhibición de la ECA, superiores al 90%, contuvieran péptidos con una secuencia tripeptídica C terminal que favoreció su unión con las regiones del centro activo de la ECA, disminuyendo su actividad (Ondetti y Cushman, 1982). De hecho estudios de Cheung y col., (1980) reportaron que aminoácidos de carácter hidrofóbico, como triptófano, tirosina, fenilalanina o prolina favorecen la unión al centro activo de la ECA. En tanto que el péptido con secuencia C-terminal fenilalanina-alanina-prolina, análogo al encontrado en el inhibidor presente en el extracto del veneno de serpiente es uno de los más favorables para unirse al centro catalítico. Así mismo está confirmado que factores como la carga positiva del grupo guanidino o del grupo ϵ -amino de la arginina o lisina, respectivamente, contribuyen a la potencia inhibitoria y que la presencia de aminoácidos dicarboxílicos en la secuencia peptídica o de prolina como penúltimo aminoácido disminuye o anula la actividad inhibitoria de la ECA (Erdös, 1976; Cushman y col., 1977). Por su parte el extremo N-terminal también influye en la actividad, y así, la presencia de Valina o de Isoleucina en esta posición incrementa la actividad inhibitoria de la ECA en el péptido.

Por otra parte los resultados de los perfiles electroforéticos de las muestras, obtenidos de las diferentes cinéticas expuestas en el punto VII.3, destacaron una mayor producción de péptidos con

probable actividad biológica, al inicio de la maduración y luego de la maduración a temperatura ambiente (21 °C) por dos semanas, de hecho se observó un descenso general en todas las muestras de la cantidad de péptidos bioactivos generados luego de madurar por 6 meses a 4 °C. Sin embargo los resultados obtenidos en este experimento demuestran que a pesar de la baja concentración, la inhibición de la ECA después de seis meses de maduración sigue siendo mayor al 70% en al menos tres de los quesos Cotija madurados.

De cualquier forma valdría la pena evaluar la actividad inhibitoria de la ECA en quesos Cotija con menor tiempo de maduración para observar en que período de maduración se generan péptidos con un mayor poder de inhibición de ECA y establecer en que intervalo los péptidos con actividad inhibitoria de la ECA liberados tras la acción de las enzimas proteolíticas de las bacterias lácticas durante el proceso de maduración, son degradados posteriormente a fragmentos inactivos (Meisel y col., 1997).

VIII. Conclusiones

- Los quesos analizados poseen un contenido de proteína diferente en cada uno de ellos. Esto puede deberse a que las condiciones climáticas y situación geográfica del lugar donde fueron elaborados, sí es un factor que afecta a la proteólisis probablemente por la diversidad microbiológica que existe en cada región; así mismo las diferentes formas de manejo y las variaciones en la composición de la leche son factores que también repercuten en la variabilidad proteica entre muestras.
- La actividad proteolítica de los quesos continúa durante la maduración en refrigeración lo que produce diferentes péptidos en diferentes tiempos.
- La maduración de los quesos almacenados durante 6 meses a temperatura de refrigeración (4 °C) ocasiona un incremento en la actividad proteolítica de los quesos.
- El análisis de proteínas por electroforesis determinó la presencia de péptidos de bajo peso molecular aseverando que dicho fenómeno es consecuencia de una proteólisis. La formación de secuencias de bajo peso molecular (menores a 1 000 Da), se lleva a cabo de forma escalonada, derivados de péptidos de peso molecular intermedio (2 000-5 000 Da), que a su vez se formaron de péptidos con pesos mayores a 5 000 Da.
- En todos los quesos analizados se encontraron péptidos cuyo peso coincide con péptidos reportados con actividad biológica, lo que incrementa las expectativas de promover estos productos como alimentos funcionales.
- El reconocimiento de que los quesos no presentan los mismos péptidos con posible actividad biológica, sugiere que sí existe una variación de la flora microbiana de cada queso que depende de la región donde se maduró y elaboró.
- Según el perfil peptídico los péptidos que se encuentran en mayor proporción en las muestras analizadas de queso Cotija son del tipo caseínofosfopeptidos con actividad transportadora de minerales e inmunomoduladora y en menor cantidad péptidos inhibidores de ECA y del tipo opioide.

- El realizar lavados con agua de sal y vinagre en los primeros tres meses de maduración en el queso número 4 del Rancho Lourdes ayudó a preservar mejor el producto de ataques microbianos durante todas las cinéticas empeladas en este estudio y principalmente durante la maduración a temperatura ambiente, debido a que se disminuye el aw como consecuencia de la cantidad mayor de cloruro de sodio presente.
- Es posible que después de 6 meses de maduración la carga microbiana disminuya y como consecuencia la cantidad de péptidos descienda al existir menor actividad proteolítica.
- La ausencia de péptidos de bajo peso molecular (menores a 1000 Da) en los quesos almacenados por 6 meses a 4 °C con lleva a suponer que la bioactividad del queso es dependiente de la etapa de maduración del queso.
- Los quesos El Lorenzo (Q1), Piedra Amarilla (Q2) y Lourdes (Q3) presentan mayor actividad antihipertensiva en la fracción proteica del suero.
- Los quesos provenientes del Rancho El Lorenzo (Q1) y Rancho Piedra Amarilla (Q2) donde se encontraron porcentajes de inhibición de la ECA superiores al 90%, valdría la pena estudiarlos más a detalle para constatar bioquímicamente si generaron durante su proteólisis una mayor cantidad de péptidos debido a una conformación de la secuencia tripeptídica C terminal que favoreció la unión con las regiones del centro activo de la ECA tal como lo menciona Ondetti y Cushman, 1982.
- El hecho de que la ECA se pueda inhibir por diversas estructuras peptídicas (por ejemplo, Valina-Prolina-Prolina, Isoleucina-Tirosina, y Lisina-Valina-Leucina-Prolina-Valina-Prolina), con lleva, a que entre más alto sea el número de grupos amino libres formado durante la proteólisis de los quesos, más alta será la probabilidad de que se generen péptidos inhibidores de ECA, sin embargo no hay que olvidar que estos péptidos deben tener la capacidad de ser solubles para que una vez en el intestino puedan actuar localmente o pasar a través de la pared intestinal a la circulación sanguínea y alcanzar los órganos con la subsecuente regulación fisiológica.

IX. Perspectivas

En esta investigación se ha demostrado que los quesos Cotija producidos en las diferentes regiones de la Sierra de Jalmich son capaces de producir péptidos que pueden tener actividad biológica y que esta producción de péptidos puede variar entre cada producto según la región donde es producida. Sin embargo, con los instrumentos utilizados es difícil determinar si en realidad los péptidos identificados tienen actividad biológica. Se tiene que hacer uso de otras técnicas tales como:

- i) Aislamiento e Identificación de péptidos por medio de ensayos enzimáticos con quimosina, tripsina o pepsina simulando procesos gástricos que permitan comprobar la resistencia de estos péptidos al proceso digestivo (Fiat y col., 1989; Lee y Lee, 2000). Así mismo se pueden realizar combinaciones de digestiones continuas para la liberación de péptidos de proteínas, para su posterior identificación y purificación por medio de cromatografía de alta presión (HPLC) (Pihlanto-Leppala y col., 1994, Hata y col., 1998).
- ii) Secuenciación por medio de resonancia magnética nuclear (RMN) o por medio de espectrometría de masas (MS). En la identificación de la secuencia de los péptidos por medio de la espectrometría de masas, estos son separados usando cromatografía de líquidos o pueden ser analizados directamente por MS. Los péptidos individuales son separados y fragmentados por colisión con un gas inerte dentro del espectrómetro de masas y las masas de los fragmentos derivados son medidas. La información generada de las masas moleculares se compara con valores teóricos de las bases de datos de péptidos para encontrar la secuencia del péptido e identificar a la proteína enlistada de acuerdo con una exactitud medida estadísticamente por un software especializado (Yanagida, 2002).
- iii) Pruebas de funcionalidad usualmente realizadas mediante ensayos biológicos con ratones con enfermedades inducidas.

Finalmente es importante destacar que en los cuatro quesos estudiados se determinaron péptidos de bajo peso molecular cuyas características aún no han sido investigadas. De forma que el campo queda abierto, para que con estos estudios se puedan realizar la determinación de los péptidos generados y su funcionalidad, para con ello dar un valor agregado a los auténticos quesos Cotija producidos en la Sierra de Jalmich, aunado a los beneficios ya reconocidos y ampliamente estudiados que pueden brindar a la salud.

✍ Bibliografía

- ✍ Abubakar A., Saito, T., Kitazawa H., Kawai Y. e Itoh, T. (1998). **Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion.** J. Dairy Sci., 81, 3131-3138.
- ✍ Alais C. (1970). **Ciencia de la leche.** 8ª reimpresión. Continental, S. A. de C. V. México; pp. 475-490.
- ✍ Alais C. (1998). **Ciencia de la leche. Principios de la Técnica lechera.** Continental, S. A. de C. V. México; pp. 40-50,70-90.
- ✍ Álvarez R., Barragán E. y Chombo P. (2004). **“Reglas de uso de la Marca Colectiva Queso Cotija, Región de Origen”**, Zamora, El Colegio de Michoacán; pp. 20.
- ✍ Amiot J. (1991). **Ciencia y tecnología de la leche. Principios y aplicaciones.** Editorial Acribia, S.A., Zaragoza España; pp. 249-267.
- ✍ Arenas C. M. (2006). **Interacción del formaldehído con las proteínas de la leche y su efecto en la elaboración de queso fresco.** Tesis de Licenciatura. UNAM, México, D. F.; pp. 43.
- ✍ Axelsson L., (1998). **Lactic acid bacteria: classification and physiology.** 1: 1-72. En: Salminen, S. y Wright, A.V. 1998. Lactic acid bacteria microbiology and functional aspects. Ed. Marcel Dekker, Inc. USA: 617.
- ✍ Baró L., Jiménez J., Martínez-Férez A. y Bouza JJ. **Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales,** Ars. Pharmaceutica, 42(3-4):135-145, 2001.
- ✍ Calvo, M. (1994). **Preparation et utilisation des proteines laitieres a activite biologique.** Revue des ENIL (178). Spécial Protéines Laitieres (111). 5-9.
- ✍ Cheeseman, G. (1981). **Rennet and Cheesemaking,** Enzymes and food processing, G.G. Birch, N.Blakebrough y K.J. Perker (comps.) Londres, Appl. Sci. Publisher, pp. 195-211.
- ✍ Cheftel J., Cuq, J., Lorient, D. (1989). **Proteínas alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo.** Modificaciones químicas, Acribia, España; pp. 179-205.
- ✍ Cheung S., Wang L., Ondetti A., Sabo F. y Cushman W. (1980). **Binding of peptides substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme.** J. Biol. Chem., 25, 401-407.
- ✍ Chombo P. (1999). **El reto que sobre la calidad enfrentan los productores de leche en Jalisco y Michoacán, como consecuencia de la apertura comercial. En: Dinámica del sistema lechero mexicano en el marco regional y global.** México, D.F.: UNAM, UAMX y Plaza Valdéz; pp. 325-358.
- ✍ Clare, D. y Swaisgood, H., (2000). **Bioactive milk peptides: a prospectus.** J. Dairy Sci. 8(6): 1187-1195.
- ✍ Cruda A., Vega y León S., Gutiérrez R. y Pérez N. (2005) **Avances en la Investigación de las Características Físicoquímicas y de Composición de la Leche.** Depto. de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco.
- ✍ Cushman D. y Cheung, H. (1971). **Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung.** Biochem. Pharmacol., 20, 1637-1648.

- ✍ Cushman W., Cheung S., Sabo F. y Ondetti A. (1977). **Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids.** *Biochemistry*, 16, 5484-5491.
- ✍ Demarigny Y., Beuvier E., Buchin S., Pochet S. and Grappin R. (1997). **Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-typ cheeses II.** *Biochemistry and sensory characteristics*. 77, 151-167.
- ✍ Dilanjan S. C. (1984). **Fundamentos de la elaboración del queso.** Editorial Acribia, S.A., Zaragoza España.
- ✍ Dionysius, D., Milne, J., (1997). **Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization.** *J. Dairy Sci.* 80: 667-664.
- ✍ Erdös, E. G. (1976). **Conversion of angiotensin I to angiotensin II.** *Am. J. Med.*, 60, 749-759.
- ✍ Eryck R., Silva H., Verdalet G. (2003). **Revisión: alimentos e ingredientes funcionales derivados de la leche.** Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana, Jalapa Veracruz, México.
- ✍ Fenema R. (1993). **Química de los alimentos.** Acribia S. A. Zaragoza, 2ª edic., España, Cap. 13.
- ✍ Fiat, M., Migliore-Samour, D., Jollès, P., Drouet, L., Bal dit Sollier, C., Caen, J., (1993). **Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities.** *J. Dairy Sci.* 76, 301-310.
- ✍ Fox F., Law J., McSweeney, P.L.H., & Wallace J. (1993). **Biochemistry of cheese ripening.** In P. F. Fox, *Cheese: Chemistry, physics and microbiology.* London, UK: Chapman and Hall. L. 1, 389-438.
- ✍ Fox F., Lucey A., and Cogan M. (1990). **Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening.** *F. Sci. Nutr.*, 29(4), 237-253.
- ✍ Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H. (2004). **Cheese Chemistry, Physics and Microbiology.** Third Edition, Vol. General Aspects. Elsevier Academia Press. London, UK, 1, 1-18.
- ✍ Fuglsang A., Nilsson D. y Nyborg C. (2002). **Cardiovascular effects of fermented milk containing angiotensin-converting enzyme inhibitors evaluated in permanently catheterized, spontaneously hypertensive rats.** *Appl. Environ Microbiol.* 68(7): 3566-3569.
- ✍ García G. y López C. (1984). **Enzimas inmovilizadas y su aplicación en la industria alimentaria.** *Ciencia y desarrollo*, 10(58), 39-48.
- ✍ García G., Quintero R. y López M. (1993). **Biología Alimentaria.** Limusa. México, D.F.; pp. 153-156, 196-198.
- ✍ García V. (2006). **Aislamiento de microorganismos con mayor actividad lipolítica del queso Cotija.** Tesis de Licenciatura. UNAM, México, D. F.; pp. 15.
- ✍ García, H. (2000). **Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia.** *Laboratorios Beterá- UNIV DIAG.* 1(2): 31-41.
- ✍ Gasson, M., De Vos, W., (1994) **Cap 4: The proteolytic system of Lactic Acid Bacteria, genetics and biotechnology of Lactic Acid Bacteria.** Editor Gasson, M., de Vos., ed. Blackie Academic Profesional and Chapman Hall, 196-210.

- ✍ Gibson G. R. y Roberfroid M. B. (1995). **Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics.** J. Nutr. 125, 1401-1412.
- ✍ Gobbetti M., Ferranti P., Smacchi E., Goffredi F. y Addeo F. (2000). **Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus SS1 and Lactococcus lactis subsp. cremoris. FT4.** App. Environ. Microbiol. 66, 3898-3904.
- ✍ Gobbetti, M., Minervini, F., Rizzello, C., (2004) **Angiotensin I-converting-enzyme – inhibitory and antimicrobial bioactive peptides.** Int. J. Dairy Tech. 57(2): 173-188.
- ✍ González L. (2004). **Liberación de péptidos bioactivos por bacterias lácticas.** Tesis de maestría. División de Ciencias Biológicas y de la Salud-UAM Iztapalapa. México, D.F. pp.35-36.
- ✍ Green, M. (1984). **Milk coagulation and development of cheese texture.** Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. F.L. Davies y B. A. Law (comps), Londres, Elsevier, pp. 84-89.
- ✍ Harsharnjit S., Doull F., Rutherford K., Cross M. (2000). **Immunoregulatory peptides in bovine milk.** . Br. J. Nutr. 84, Suppl.1, S111-S117.
- ✍ Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y. y Takano, T. (1996). **A placebo controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects.** Am. J. Clin. Nutr., 64, 767-771.
- ✍ Hermansen E., Ostersen S., Justesen C., Aaes O. (1999) **Effects of dietary protein supply on caseins, whey proteins, proteolysis and renneting properties in milk from cows grazing clover or N fertilized grass.** J. Dairy Res.; 66(2):193-205.
- ✍ Hernández B. (2002). **Caracterización y bioactividad de péptidos obtenidos a partir de proteínas lácteas mediante hidrólisis enzimática y procesos fermentativos.** Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España. Depto. de Nutrición y Bromatología II.. Madrid, España pp. 46-60.
- ✍ Ing=iso>. ISSN 0004-0622.)
- ✍ Jiménez J., García M. (2006). **Propiedades Nutraceuticas de las Proteínas del Suero de Leche.** Carnilac Industrial 21 (5), 22-26.
- ✍ Kim K., Yoon S., Yu Y., Lönnerdal B. y Chung, H. (1999). **Novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human α s1-casein expressed in Escherichia coli.** J. Dairy Res.; 66, 431-439.
- ✍ Klei L., Lynch J., Barbano D., Oltenacu P., Lednor A., Bandler D. (1997). **Influence of Milking Three Times a Day on Milk Quality.** J. Dairy Sci. 80:427-436.
- ✍ Korhonen, H., & Pihlanto, A., (2003) **Bioactive peptides and proteins.** Adv. Food Nutr. Res. 47: 175-276
- ✍ Leporanta K. (2001). **Developing fermented milks into functional foods.** Innovations Food Technol., 10, 46-47.
- ✍ Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. (1951). **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** L. boil. Cham., 193,253.
- ✍ Luquet F. M. (1991). **Leche y productos lácteos.** Acribia S. A. Zaragoza, Vol. I, España; Cap. I.
- ✍ Madrid V. A. (1999). **Tecnología quesera.** 2ª Edición. Mundi Prensa Madrid, España. Cap. I.

- ✂ Marilley L. y Casey G. (2004). **Flavours of cheese products: Metabolic pathways, analytical tools and identification for producing strains.** *Int. J. Food Microbiol.* 90 (2), 139-159.
- ✂ Martín Del Campo Y. (2006). **Efecto de la conservación y el tiempo de almacenamiento sobre la microflora del queso suave de leche de cabra.** Tesis de Licenciatura. UNAM, México, D. F.; pp. 19.
- ✂ Martínez O. y Martínez E. (2006). **Proteínas y péptidos en nutrición enteral.** *Nutrición Hospitalaria.* 21 (2), 1-14.
- ✂ McSweeney P., Sousa M. (2000). **Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening: a review.** *Le Lait* 80, 293-324.
- ✂ Meisel H. (1997). **Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins.** *Inc. Biopoly.* 43:119-128.
- ✂ Meisel H., Frister H. y Schlimme E. (1989). **Biologically active peptides in milk proteins.** *Z. Ernährungswiss.,* 28, 267-278.
- ✂ Meisel, H. Bockelmann, W., (1999). **Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and tropho-functional properties.** *Antonie van Leeuwenhock* 76: 207-215.
- ✂ Meisel, H. Fitzgerald, R.,(2003). **Biofunctional peptides from Milk Proteins: mineral binding and cytomodulatory effects.** *Curr. Pharm. Des.,* 9:1289-1295.
- ✂ Ney K. (1979). **Bitterness of peptides: amino acid composition and chain length.** En J. C. Bondreau (Ed.), *Food Taste Chemistry* Washington D.C.: American Chemical Society.
- ✂ Nighswonger B., Brashers M., Gilliland E. (1996). **Viability of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei in fermented milk products during refrigerated storage.** *J. Dairy Sci.* 79:212-219.
- ✂ Ondetti A., y Cushman W., (1982). **Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors.** *Ann. Rev. Biochem.,* 51, 283-308.
- ✂ Ostersen S, Foldager J, Hermansen E. (1997) **Effects of stage of lactation, milk protein genotype and body condition at calving on protein composition and renneting properties of bovine milk.** *J. Dairy Res;* 64(2):207-19.
- ✂ Pihlanto-Leppälä A., Koskinen, P., Piilola K., Tupasela, T. y Korhonen, H. (2000). **Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides.** *J. Dairy Res.,* 67, 53-64.
- ✂ Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T. y Korhonen, H. (1998). **Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from bovine milk proteins.** *Int. Dairy J.,* 8, 325-331.
- ✂ Poméon T. (2007). **El Queso Cotija México un producto con marca Colectiva queso "Cotija región de Origen", en proceso de adquisición de una Denominación de Origen.** Consultoría realizada para la FAO y el IICA en el marco del estudio conjunto sobre los productos de calidad vinculada al origen. CIESTAAM, Universidad Autónoma Chapingo; pp. 48.
- ✂ Raisman S. y González A. (2005). **Hipertextos del área de biología.** (Disponible en línea <http://www.biologia.edu.ar/metabolismo/index.htm>).
- ✂ Rangel R. (2003). **Proteólisis de la leche cruda almacenada en frío. Efecto de las enzimas proteolíticas sobre la integridad de las caseínas.** *Revista Científica, FCV-LUZ.* 13:187-92.

- ✎ Remaud, G. (2003). **Why small agrifood firms exist?** The case of French agrifood sector. International Food and Agribusiness Management Association. World Food and Agribusiness Symposium. Cancún, México.
- ✎ Riel R. (1993). **Ciencia y tecnología de la Leche**. Acribia, S.A., Zaragoza España. Cap. 1.
- ✎ Rokka, T., Syvaaja, E., Tuominen, J., Korhonen, H. (1997). **Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of Lactobacillus GG fermented UHT milk**. *Milchwissenschaft* 52 (12) 675-677.
- ✎ Saito, T., Nakamura T., Kitazawa H., Kawai Y., Itoh T. (2000). **Isolation and structural analysis of Antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda Cheese**. *J. Dairy Sci.* 83, 1434-1440.
- ✎ Saldo J. (2002). **Cambios en las características de un queso de leche de cabra sometido a alta presión hidrostática. Aceleración de la maduración**. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España. pp. 7-9. Disponible en línea http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-1209102-51429//jsp1de6.
- ✎ Sato R., Noguchi T. y Naito H. (1986). **Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine**. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 32, 67-76.
- ✎ Schlimme, E. y Meisel, H. (1995). **Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects**. *Nahrung*, 39, 1-20.
- ✎ Scott R. (1991). **Fabricación de Queso**. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza España. Cap. 6 y Cap. 16.
- ✎ Scott, R. (1969). **Rennets and Cheese**, Topics in Enzyme and fermentation biotechnology 3, Londres, A. Wiseman (cop.) Ellis Horwood, pp. 103-169.
- ✎ Scott, R. (1986). **Cheseemaking Practice**, Londres, Elsevier.
- ✎ Shan Nagendra P. (2000) **Effects of milk-derived bioactives: an overview**. *Br. J. Nutr.* 84, Suppl.1, S3-S10.
- ✎ Silva V. y Malcata F. (2005). **Casein as source of bioactive peptides**. *Int. Dairy J.* 15, 1-15.
- ✎ Smacchi E., Gobetti M. (2000). **Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes**. *Food Microbiol.* 17,129-141.
- ✎ Sugai R. (1998). **ACE inhibitors and functional foods**. *IDF Bulletin*, 336, 17-20.
- ✎ Takano T. (1998). **Milk derived peptides and hypertension reduction**. *Int. Dairy J.*, 8, 375-381.
- ✎ Tavaría K., Taveres G., Silva C. y Malcata F. (2005). **Contribution of coagulant and native microflora to the volatile-free fatty acid profile of an artisanal cheese**. *Int. Dairy J.* (Disponible en línea www.elsevier.com/locate/airyj).
- ✎ Torres M., Vallejo B., e González A. (2005). **Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche**. *ALAN*. [online].5(2):111-117. (Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-6222005000200002&
- ✎ Vega y León S., Vega & Rojo A., Pérez N., Gutiérrez R., González M., Urbán G. (2003). **Sustancias Funcionales en Leche y Derivados**. *Lácteos y Cárnicos Mexicanos*; 18, 25-35.
- ✎ Walstra, P. y Jenness, R. (1984). **Outline of milk composition and structure**. En *Dairy Chemistry and Physics*. John Wiley and sons. New York. pp. 1-11.

- ✍ Yabar V. (2003). **Manual de Procedimientos de electroforésis para proteínas y ADN**. Centro Nacional de Salud Pública. Instituto Nacional de Salud. Lima Perú. pp. 7-69.
- ✍ Yamamoto N., Maeno M. y Takano T. (1999). **Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CRN4**. J. Dairy Sci., 82, 1388-1393.
- ✍ Yanagida M. **Functional proteomics: current achievements**. J Chromatography B. 2002;771: 89-106.

XI. Anexos

XI.1. Preparación de Soluciones para Extracción de Proteína

XI.1.1. Buffer de fosfatos 0.1M a pH 7

Pesar 0.345g de NaH_2PO_4 (J. T. Baker, México, 3818-01 CAS No. 10049-21-5 Lote K 20453) y 0.356g de Na_2HPO_4 (J. T. Baker, México, 3818-01 CAS No. 7558-79-4 Lote 6009). Aforar los fosfatos con agua desionizada por separado en un matraz de 250 mL y posteriormente ajustar el pH agregando el NaH_2PO_4 al Na_2HPO_4 hasta tener un pH de 7.0.

XI.1.2. Solución de HCl 1.5M

Tomar 61.17 mL de HCl (J.T. Baker, Xalostoc, México) y aforar con agua desionizada a 500mL en la campana.

XI.1.3. Solución de Urea 8M a pH 8.

Pesar 120g de urea (J. T. Baker, México, 4204-01 CAS No. 57-13-6) añadir agua destilada y poner a calentar en agitación para disolver; una vez disuelta aforar a 250 mL.

XI.2. Preparación de Soluciones para el Método de Lowry y Curva Patrón

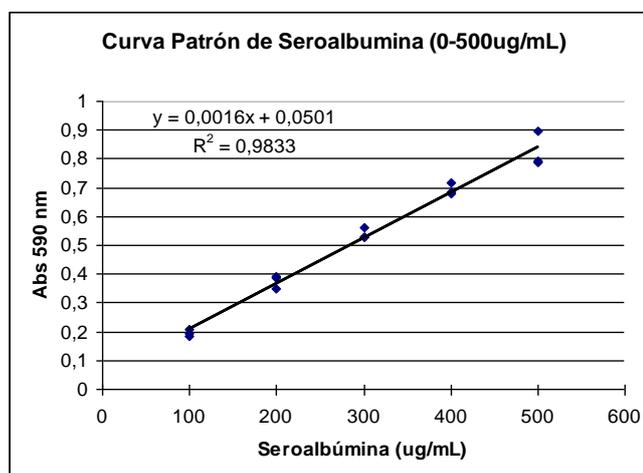
Curva Patrón

La determinación de la curva se realizó por triplicado.

Absorbancias de las diferentes concentraciones de seroalbúmina, para la realización de la curva patrón

Seroalbúmina ($\mu\text{g/mL}$)	Abs λ 590nm		
	Serie 1	Serie 2	Serie 3
100	0.182	0.206	0.192
200	0.385	0.348	0.390
300	0.529	0.560	0.527
400	0.686	0.715	0.679
500	0.794	0.896	0.786

Curva patrón de seroalbúmina



XI.2.1. Solución A (Carbonato de Sodio al 2% en Hidróxido de Sodio al 0.1N)

Pesar 5g de NaHCO_3 (J. T. Baker, Xalostoc, México) y 1g de NaOH (J.T. Baker, Xalostoc, México). Disolver la cantidad de NaOH en agua desionizada y aforar a 250 mL posteriormente adicionar la cantidad de NaHCO_3 y agitar para disolver.

XI.2.2. Solución B (Sulfato de Cobre al 1%)

Pesar 0.2g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (J.T. Baker, Xalostoc, México) y aforar con agua desionizada a 20 mL.

XI.2.3. Solución C (Tartrato de Sodio al 2%)

Pesar 0.4g de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (J.T. Baker, Xalostoc, México) y aforar con agua desionizada a 20 mL.

XI.2.4. Solución D (Reactivo de Folin 1:1)

Preparar el reactivo de Folin -Ciocalteau (Aldrich, E.U.A.) diluido en agua destilada proporción 1:1 (v/v).

XI.3. Soluciones para Electroforesis

XI.3.1. Soluciones para Electroforesis Nativa

Solución Amortiguadora pH 8.8

Forma de Preparación:

Tris-HCl 1.5 M.....(36.342g/200mL)
 SDS al 0.3%.....(0.6g/ 200mL)
 Ajustar el pH a 8.8 con HCl.

Solución Amortiguadora pH 6.8

Forma de Preparación:

Tris-HCl 0.5 M.....(12.4g /200mL)
 SDS al 0.3%.....(0.6g/ 200mL)
 Ajustar el pH a 6.8 con HCl.

Solución stock de acrilamida (30% T, C 3%)

Forma de Preparación:

Porcentaje de acrilamida 30 %.....(15g/50mL)
 Porcentaje de bis-acrilamida 3%.....(1.5g/50mL)
 Solución amortiguadora (Tris 3.0M, SDS al 0.3%; ajustar pH a 8.8 con HCl)

SDS 10%

Disolver 0.1g =100mg de SDS en 1mL de agua desionizada.

Persulfato de amonio al 10%

Para 40 µL, se ponen 4 mg en 4 µL de buffer 8.45.

Gel de Separación (T 12.5% , C4%)

Para 2 Geles

Solución stock 30 %.....4.667 mL
 Solución pH 8.8.....3.333 mL
 Solución SDS 10 %.....80µL L

Dejar airear 15 min. y luego adicionar:

Persulfato de amonio al 10% (Prepararse al momento).....40 µL
 TEMED.....4 µL

Inyectar la solución en el equipo montado a 4/5 partes del total del gel y agregar agua con el fin de quede plana. **Dejar durante 1 hora.**

Gel de Concentración (T 4%, C 3%)

Para 2 geles

Solución stock 30 %	0.798 mL
Solución pH 6.8.....	5.160 mL
Solución SDS 10 %.....	60µL

Dejar airear 15 min. y luego adicionar:

Persulfato de amonio al 10% (Prepararse al momento).....	30 µL
TEMED.....	6 µL

Inyectar la solución retirando el agua anteriormente colocada e introducir el peine que forma los pocillos donde se depositarían las muestras. Dejar polimerizar 1 hora y mientras tanto preparar solución de corrida.

Solución de Corrida 5X

Para 2 Geles

Tris base	3g
Glicina.....	21.6g
SDS 0.1%.....	150 mg

Colocar en 300 mL de agua desionizada y ajustar el pH a 8.3 con HCl.

Una vez que se vaya a emplear diluir 60 mL del Buffer 5X con 250 mL de agua desionizada para cada corrida electroforética.

Buffer del Estándar (Polipéptidos) y de Muestras

Agua desionizada 4.0 mL.....	3.8mL
Buffer Tris- HCl 0.5 M pH 6.8.....	1.0mL
Glicerol.....	0.8mL
SDS 10%.....	1.6 mL
β-Mercaptoetanol	0.4mL
Coomasie G-250 0.5%.....	0.4mL

* Agitar la mezcla en el vortex y congelar hasta su uso.

Preparación del Estándar (Polipéptidos) 1:20

	Para 2 Inyecciones
Buffer de la Muestra.....	36.5 µL
β-Mercaptoetanol.....	1.5 µL
Estándar.....	2 µL

* Agitar la mezcla en el vortex.

Preparación de Muestras

	Para 2 Inyecciones
Buffer de la Muestra.....	20 µL
Muestra.....	40 µL

Solución de Teñido

Azul de Coomasie.....	250 mg
Metanol 40%.....	40mL
Agua desionizada50%.....	50mL
Acido Acético10%.....	10mL

* Agitar la mezcla y guardar hasta su uso.

Solución Destiñidora

Metanol 40%.....	40mL
Agua desionizada50%.....	50mL
Acido Acético10%.....	10mL

Nota: Toda el agua utilizada para las soluciones y durante todo el proceso de electroforesis, debe ser desionizada

XI.3.2. Soluciones para Electroforesis de Péptidos

Solución Amortiguadora pH 8.45:

Forma de Preparación:

Tris 3 M(72.684g/ 200mL)
 SDS al 0.3%.....(0.6g/ 200mL)
 Ajustar el pH a 8.45 con HCl.

Solución stock de acrilamida (49% T; C 6%)

Forma de Preparación:

Porcentaje de acrilamida 46.5 %.....(23.25g/50mL)
 Porcentaje de bis-acrilamida 3%.....(1.5g/50mL)
 Solución amortiguadora (Tris 3.0M, SDS al 0.3%; ajustar pH a 8.45 con HCl)

SDS 10%

Disolver 0.1g =100mg de SDS en 1mL de agua desionizada.

Persulfato de amonio al 10%

Para 40 μ L, se ponen 4 mg en 4 μ L de buffer 8.45.

Gel de Separación (T 18% , C 6%)

Para 2 Geles

Solución stock 49.5 %.....3.23 mL
 Solución pH 8.45.....4.76 mL
 Solución SDS 10 %.....160 μ L L

Dejar airear 15 min. y luego adicionar:

Persulfato de amonio al 10% (Prepararse al momento).....35 μ L
 TEMED.....5 μ L

Inyectar la solución en el equipo montado a 4/5 partes del total del gel y agregar agua con el fin de quede plana. **Dejar melificar toda la noche.**

Gel de Concentración (T 4%, C 6%)

Para 2 geles

Solución stock 49.5 %0.320 mL
 Solución pH 8.45..... 3.354 mL
 Solución SDS 10 %.....80 μ L

Dejar airear 15 min. y luego adicionar:

Persulfato de amonio al 10% (Prepararse al momento).....	50 μ L
TEMED.....	5 μ L

Inyectar la solución retirando el agua anteriormente colocada e introducir el peine que forma los pocillos donde se depositarían las muestras. Dejar polimerizar 1 hora y mientras tanto preparar solución de corrida.

Solución de Corrida

Para 2 Geles

Tris base 0.1 M.....	3.63g
Tricina 0.1 M.....	5.39g
SDS 0.1%.....	300 mg

Colocar en 300 mL de agua desionizada y ajustar el pH a 8.25 con HCl.

Buffer del Estándar (Polipéptidos) y de Muestras

Agua desionizada 4.0 mL.....	4.0mL
Buffer Tris- HCl 0.5 M.....	2.0mL
Glicerol.....	2.4mL
SDS 10%.....	1.0 mL
β -Mercaptoetanol	0.2mL
Coomasie G-250 0.5%.....	0.4mL

* Agitar la mezcla en el vortex y congelar hasta su uso.

Preparación del Estándar (Polipéptidos) 1:20

Para 2 Inyecciones

Buffer de la Muestra.....	36.5 μ L
β -Mercaptoetanol.....	1.5 μ L
Estándar.....	2 μ L

* Agitar la mezcla en el vortex.

Preparación de Muestras

Para 2 Inyecciones

Buffer de la Muestra.....	20 μ L
Muestra.....	40 μ L

Solución Destiñidora

Metanol 50%.....	50mL
Agua desionizada 40%.....	40mL
Acido Acético 10%.....	10mL

Nota: Toda el agua utilizada para las soluciones y durante todo el proceso de electroforesis, debe ser desionizada

XI.4. Estándares utilizados para la electroforesis***XI.4.1. Estándar de Amplio Rango (Broad Bio-Rad)***

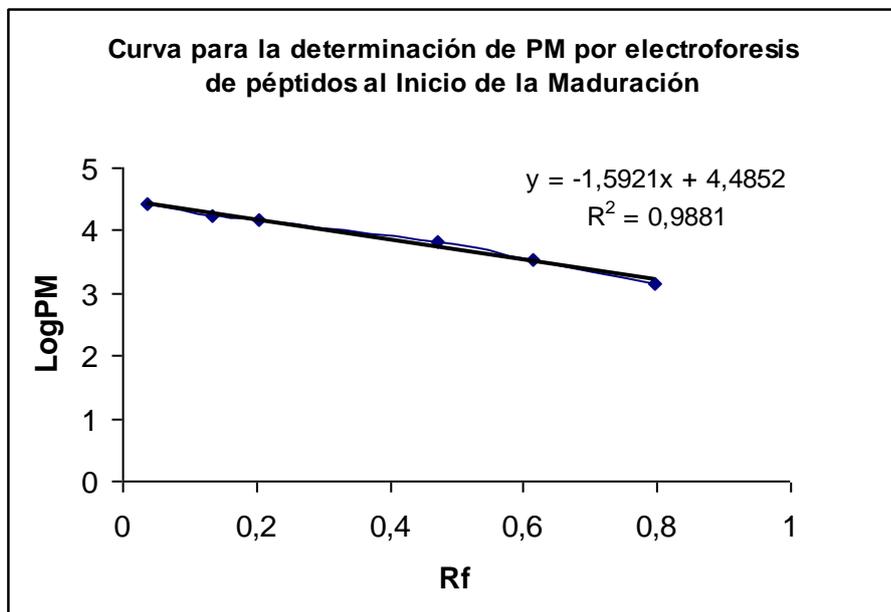
Proteína	Peso molecular (Da)
Fosforilasa b	97,400
Seroalbúmina	66,200
Ovoalbúmina	45,000
Anhidrasa carbónica	31,000
Inhibidor de tripsina	21,500
Lisozima	14,400

XI.4.2. Estándar de Polipéptidos (Polypeptide Bio-Rad)

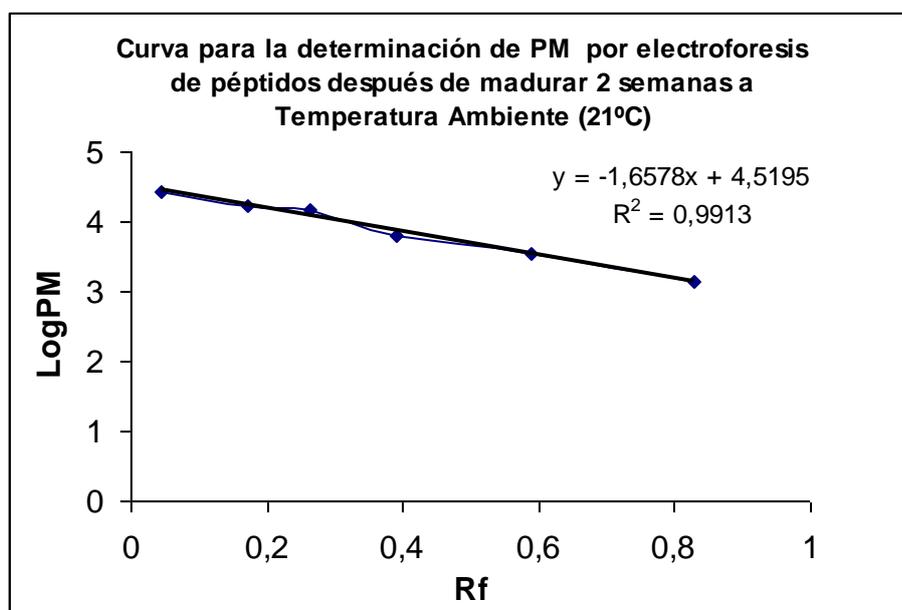
Proteína	Peso molecular (Da)
Triosafosfato isomerasa	26,625
Mioglobina	16,950
α -Lactoalbúmina	14,437
Aprotinina	6,517
Insulina b, oxidada	3,496
Bacitracina	1,423

XI.5. Curvas patrón

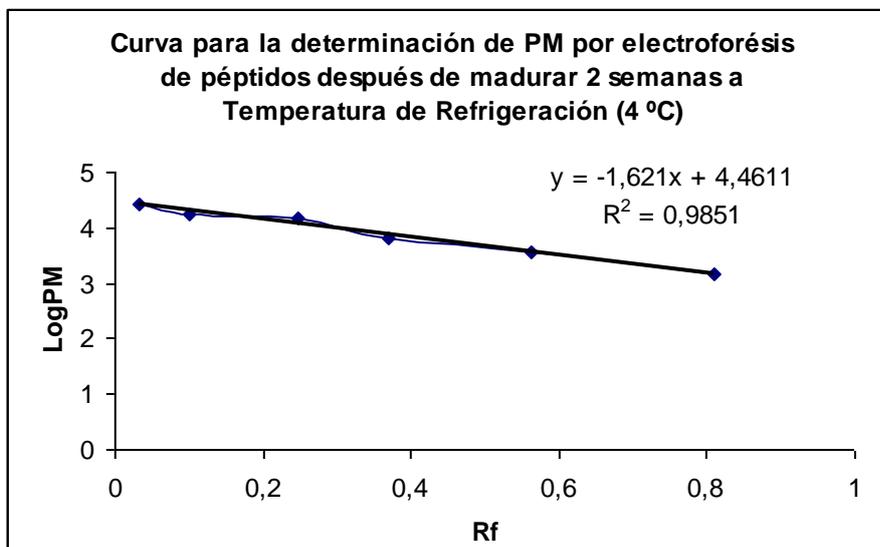
XI.5.1. Curva patrón para el cálculo de pesos moleculares de péptidos al inicio de la maduración.



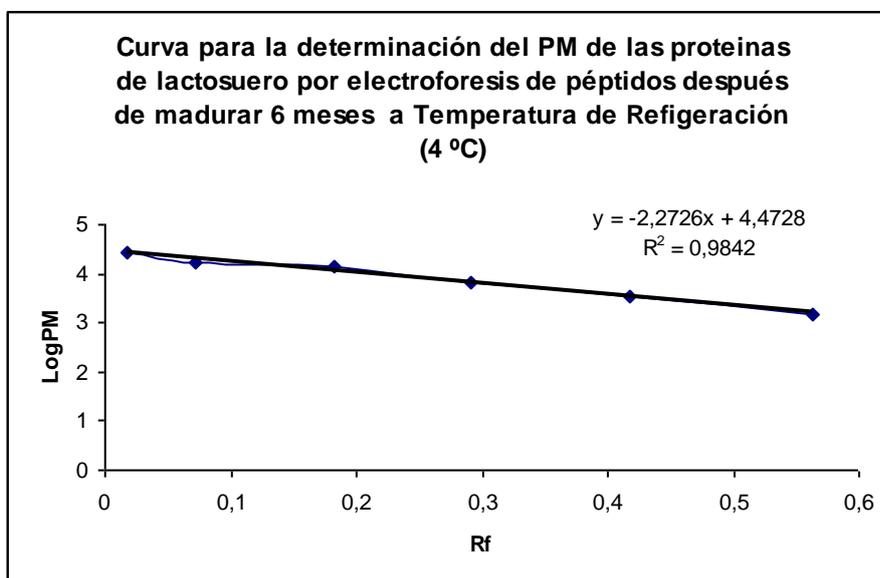
XI.5.2. Curva patrón para la determinación de pesos moleculares de péptidos durante el tiempo de maduración 2 semanas a Temperatura Ambiente (21 °C).



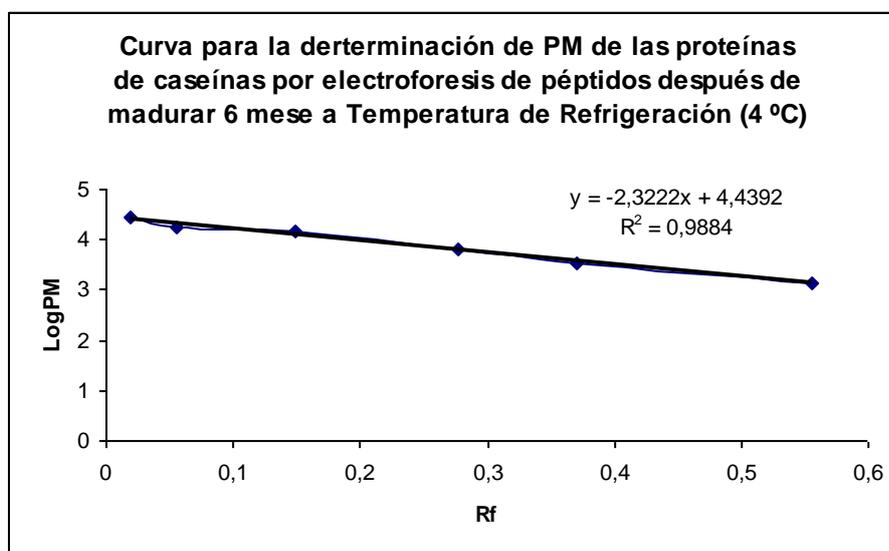
XI.5.3. Curvas patrón para la determinación de pesos moleculares de péptidos encontrados durante el tiempo de maduración de 2 semanas a Temperatura de Refrigeración (4 °C).



XI.5.4. Curva patrón para la determinación de pesos moleculares de los péptidos del suero encontrados después de madurar 6 meses a Temperatura de Refrigeración (4 °C).



XI.5.5. Curva patrón para la determinación de pesos moleculares de los péptidos de la fracción de proteína total encontrados después de madurar 6 meses a Temperatura de Refrigeración (4 °C).



XI.6. Soluciones para la Determinación de Actividad Antihipertensiva.

XI.6.1. Solución de NaOH 10 N

Disolver 2 g de NaOH en agua desionizada y aforar a 5 mL.

XI.6.2. Buffer de Boratos 0.1M, pH 8.3; 0.3 M de NaCl

Pesar 61.8 mg de ácido bórico y aforar a 10 mL. A continuación disolver 175.32 mg de NaCl en la solución ya aforada, agitar y ajustar el pH a 8.3M.

XI.6.3. Buffer de Boratos 0.1M, pH 8.3; 0.3 M de NaCl con Sustrato HHL

Pesar 21.5 mg de HHL y disolverlos en el buffer de boratos a 0.1M, pH a 8.3M con 0.3 M de NaCl.

Nota: Todos los reactivos empleados son J.T. Baker, Xalostoc, México.