

## Actividad proteolítica en filtrados obtenidos de queso fresco comercial.

Galván Martínez D.M., Gómez Salazar J. A., Mireles Arriaga A. I., Rodríguez Hernández G\*.

División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato, Departamento de Alimentos. Ex Hacienda El Copal km 9; Carretera Irapuato-Silao; A.P. 311; CP 36500; Irapuato, Guanajuato. \*gabriela.rodrigues@ugto.mx

### RESUMEN

En el presente estudio se buscó determinar la actividad proteolítica y la concentración peptídica total en filtrados peptídicos de cinco muestras distintas de quesos frescos de marcas comerciales populares de la ciudad de Irapuato, Guanajuato y establecer las diferencias estadísticas entre las muestras obtenidas de las diferentes queserías para los parámetros evaluados. Encontrándose diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) entre la actividad proteolítica y la concentración peptídica de las muestras de queso en función a su procedencia..

Palabras clave: proteólisis, queso fresco, bacterias ácido lácticas

### ABSTRACT

In the present study, the aim was to determine the proteolytic activity and the total peptide concentration in peptidic filtrated of five different samples of cheese from popular commercial brands in Irapuato, Guanajuato, and to establish the statistical differences between the samples of the different cheese factories by the parameters evaluated. There were significant differences ( $P < 0.05$ ) between the proteolytic activity and the peptide concentration of the cheese samples according to their origin..

Key words: proteolysis, fresh cheese, lactic acid bacteria

Categoría. Lácteos

### INTRODUCCIÓN:

Los quesos son productos elaborados con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado (NOM-121-SSA1-1994). La fermentación de la leche se da principalmente por la acción de los microorganismos que forman parte de los cultivos usados en la manufactura de productos lácteos, particularmente las BAL (González-González *et al.*, 2011). La actividad proteolítica y la producción de sabor son parámetros a tomar en cuenta para la selección industrial de cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) para la producción de queso (Eman *et al.*, 2000). Debido a que de las BAL seleccionadas dependerán en gran medida las características organolépticas del queso (Boutrou *et al.*, 1998). La proteólisis es la degradación de las proteínas por la acción del sistema proteolítico de las BAL para liberar pequeños péptidos y aminoácidos (Smit *et al.*, 2005). Durante el proceso de fermentación de los quesos, el sistema proteolítico de los cultivos iniciadores juegan un rol crucial (Serra *et al.*, 2009). De los microorganismos que se encuentran frecuentemente formando parte de los cultivos iniciadores, los más estudiados son *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. (Ebringer *et al.*, 2008). La proteólisis es iniciada por una sola proteinasa extracelular, sin embargo, algunas BAL no sintetizan proteinasas extracelulares, en este caso dependen de otras cepas que liberen las proteinasas al medio. Dentro de la proteólisis se distinguen la proteólisis primaria, que es la responsable de la textura blanda característica al principio de la obtención de la cuajada, y la proteólisis secundaria, en la que se generan péptidos de pequeño tamaño y alta hidrofobicidad que detectados por los receptores del sabor producen la sensación de amargor. Estos péptidos sirven como substratos precursores para las proteinasas y peptidasas bacterianas que los transforman en péptidos más pequeños y aminoácidos libres (Ferrandini-Banchero, 2006). Los aminoácidos, provenientes de la degradación de las proteínas durante la maduración del queso, pueden variar en cantidad e incluso en los tipos de aminoácido debido al catabolismo de los mismos. El proceso de proteólisis productos lácteos puede variar dependiendo del producto lácteo que sea objeto de estudio (Serra *et al.*, 2009). El objetivo del presente estudio fue

evaluar la actividad proteolítica y la concentración peptídica en filtrados obtenidos de muestras de quesos frescos comerciales.

### MATERIALES Y MÉTODOS

**Toma de muestras.** Se tomaron muestras de 5 marcas comerciales de queso fresco, según la NOM-109-SSA1-1994.

**Preparación de los filtrados.** Las muestras se trataron según lo descrito por Donkor *et al.* (2007), para lo cual se tomaron 7.5 g de queso y se mezclaron con 30 mL de ácido tricloroacético (ATC) al 0.75%, pasándose la mezcla a través de papel filtro (Whatman no. 1 de 150 mm), obteniéndose los filtrados de los quesos (FQ), mismos que fueron congelados (-20 °C) hasta su análisis. Este filtrado permitió solo el paso de los péptidos y a la vez concentrarlos en los FQ.

**Actividad proteolítica.** Se determinó el porcentaje de proteólisis de cada uno de los FQ por quintuplicado, con base en la reacción de las aminos primarias (NH<sub>3</sub>) libres con O-phthaldialdehído (OPA) y β-mercaptoetanol, según el método de Church *et al.* (1983) en el cual se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis a una longitud de onda de 340 nm. El reactivo OPA se preparó de la siguiente manera: 25 mL de tetraborato de sodio 100mM, 2.5 mL de Sodio Duodecil Sulfato (SDS) al 20 %, 40 mg de OPA en 1 mL de metanol, 100 μL de β-mercaptoetanol, y se afora a 50 mL con agua tridestilada. Para las lecturas se tomaron 50 μL de cada muestra filtrada, y se mezclaron con 1 mL del reactivo OPA por inversión de la celda de cuarzo, con 2 min de incubación a temperatura ambiente y dentro del equipo para evitar la exposición a la luz.

**Concentración peptídica total.** Se cuantificó el contenido peptídico en cada uno de los FQ por sextuplicado, usando el método de Bradford (1976). Este se basa en la reacción de las proteínas con el colorante azul brillante de Comassie G-250, para formar un compuesto colorido que absorbe fuertemente a los 595 nm. Para analizar las muestras se tomaron 0.2 ml de los FQ o del estándar y se mezclaron con 2 ml del reactivo de Bradford, se agitó por inmersión tres veces y se tomaron las lecturas después de una incubación en obscuridad a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis. Para determinar las concentraciones de cada muestra se realizó una ecuación de regresión usando una curva estándar con albúmina de suero bovino a las concentraciones 0.02, 0.2, 0.4 y 0.6 mg/ml.

**Análisis estadístico.** Los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico SAS (2006). Primeramente se llevó a cabo un análisis de varianza con el PROC GLM y para la comparación de medias entre muestras, se utilizó la prueba de TUKEY, usando como variables clasificatorias las variables determinadas (concentración peptídica y proteólisis) y las sus repeticiones, considerando el siguiente modelo (Ec. 1):

$$\text{Ec. 1. } y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

$y_{ij}$  = variable de respuesta en la j-ésima repetición de la i-ésima muestra de queso.

$\mu$  = media general.

$\tau_i$  = efecto fijo de la i-ésimo quesería.

$\epsilon_{ij}$  = error aleatorio distribuido en forma normal con media cero y varianza, donde  $\epsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$ .

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Determinación de la actividad proteolítica

Los datos obtenidos del análisis de la actividad proteolítica muestran que existen diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) entre las muestras 2 y 3, y las muestras 3 y 5. La muestra que presentó una mayor absorbancia promedio es la 1, lo que indica que es el queso que presenta mayor actividad proteolítica, mientras que la muestra 4 fue en la que se detectó menor actividad proteolítica, lo cual indica una diferencia de 0.398, como se observa en la Figura 1. Comparando los resultados obtenidos en este trabajo con los de Donkor *et al* en 2007, los cuales realizaron

también el análisis de la actividad proteolítica en filtrados de yogurt elaborado con leche entera de vaca obteniendo densidades ópticas altas en comparación con las de éste estudio.

**Figura 1. Actividad proteolítica medida en filtrados de muestras de queso fresco comercial.**

Quesería	Absorbancia ( $\lambda=340\text{nm}$ )
1	0.797 $\pm$ 0.02738 <sup>a</sup>
2	0.677 $\pm$ 0.00675 <sup>b</sup>
3	0.603 $\pm$ 0.06210 <sup>b</sup>
4	0.38325 $\pm$ 0.00844 <sup>c</sup>
5	0.399 $\pm$ 0.05386 <sup>c</sup>

<sup>a, b, c</sup>Literales diferentes en una misma columna indican diferencias significativas en las muestras (P<0.01).

#### Determinación de la concentración peptídica total en los filtrados de los quesos.

Para determinar la concentración de péptidos totales de los FQ, se realizó una curva de calibración con albúmina de suero bovino, y se obtuvieron los resultados que están plasmados en la figura 2, donde se puede observar que las muestras con mayor concentración peptídica corresponde a las queserías 1 y 4, por otro lado las muestras 2 y 5 presentan concentraciones iguales de péptidos totales y la quesería 3 es la que tiene menor concentración peptídica total. Si se compara la concentración peptídica total obtenida en este estudio con la de Rodríguez-Hernández y Chavez-Martínez (2018), tenemos que estas marcas de queso comercial analizadas tienen una concentración peptídica más elevada en comparación con los filtrados obtenidos de los tratamientos de los yogurts elaborados con leche de cabra. En otro estudio realizado por Alonzo-Paz *et al* (2016) se evaluó la concentración peptídica total en queso Cotija y se obtuvieron valores desde los 5.4 mg hasta los 2.4 mg, valores que son mucho más elevados que los obtenidos en los quesos frescos muestreados.

Figura 2. Concentración peptídica total de los filtrados de queso fresco comercial

Quesería	Concentración en mg/ml
1	0.26 $\pm$ 0.040 <sup>a</sup>
2	0.18 $\pm$ 0.006 <sup>b</sup>
3	0.13 $\pm$ 0.019 <sup>c</sup>
4	0.25 $\pm$ 0.015 <sup>a</sup>
5	0.18 $\pm$ 0.015 <sup>b</sup>

<sup>a, b, c</sup>Literales diferentes en una misma columna indican diferencias significativas en las muestras (P<0.01).

#### CONCLUSIÓN

Se encontraron diferencias estadísticas tanto en la proteólisis como en la concentración peptídica total de las diferentes queserías de la ciudad de Irapuato. Comparando los resultados obtenidos en cada prueba se concluye que para la quesería 1 tiene tanto mayor concentración de péptidos totales como actividad proteolítica. Mientras que si nos enfocamos en el queso con mayor concentración de péptidos totales serían las muestras 1 y 4. Y en comparación con otros productos lácteos como los son el yogurt elaborado con leche ya sea de vaca o de cabra presentan mayor actividad proteolítica que los quesos frescos de las marcas comerciales analizados en este estudio, no obstante, si se compara la concentración de péptidos totales se puede observar que los quesos analizados presentan mayores concentraciones comparándolos con las que se presentan en el yogurt elaborado con

leche de cabra, sin embargo comparándolos con el queso Cotija, las concentraciones de péptidos totales en los quesos muestreados son muy bajas.

## BIBLIOGRAFÍA.

- Alonzo-Paz A. L., Lugo-Cervantes E. C., Tovar-Pérez E. G. y Chombo-Morales M. P. 2016. Evaluación de la proteólisis del queso Cotija región de origen<sup>MC</sup> asociado al tiempo de maduración. Memorias del XXXVII Encuentro Nacional de la AMIDIQ.
- Boutrou R., Sepulchre A., Gripon J., Monnet V. 1998 Simple test for predicting the lytic behavior and proteolytic activity of *lactococcal* strains in cheese. *Journal of Dairy Science* 81: 2321-2328.
- Bradford, M. M. 1976 A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding en *Analytical Biochemistry* 72. 248-254
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., D. H. Porter y G. L. Catignani. 1983. Department of food science spectrophotometric assay using o-phthaldialdehy de for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins *J. Dairy Sci.* 66: 1219-1227.
- Donkor, O. N., A. Henriksson, T. K. Singh, T. Vasiljevic y N. P. Shah. 2007. ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *Int. Dairy J.* 17:1321–1331.
- Ebringer, L., M., Ferencik y J. Krajcovi. 2008. Beneficial health effects of milk and fermented dairy products – review. *Folia Microbiol.* 53:378–394.
- Eman H., Ayad A., Wouters J., Smit G. 2000 Application of wild starter cultures for flavor development in pilot plant cheese making. *International Dairy Journal* 10: 169-179.
- Ferrandini-Banchero, E. 2006. Elaboración de queso de Murcia al vino con cuajo natural en pasta. Murcia: Universidad de Murcia. (Tesis de Doctorado)
- González-González, C. R., K. M. Tuohy y P. Jauregi. 2011. Production of angiotensin - I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with pH and peptides on the ACE-inhibitory activity. *Int. Dairy J.* 21: 615-622.
- Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994, Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. 26 de mayo de 1994
- Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994. Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. *Diario Oficial de la Federación.* 28 de Mayo de 1996.
- Rodríguez-Hernández G. y Chávez-Martínez A. 2018 Actividad proteolítica y concentración peptídica en yogur de leche de cabra adicionado con probióticos. *Interciencia* 43: 50-54
- Serra, M., A. J. Trujillo, B. Guamis y V. Ferragut. 2009. Proteolysis of yogurts made from ultra-high-pressure homogenized milk during cold storage. *J. Dairy Sci.* 92:71-78.
- Smit G., Smit B., Engels W. 2005 Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews* 29:591-560.