

## Actividad proteolítica en bebidas a base de suero de queso fermentadas con diferentes probióticos.

Olvera Torres D., Cerón García A., Gómez Salazar J. A. y Rodríguez Hernández G\*.

<sup>a</sup> Departamento de Alimentos. División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato, Carretera Irapuato-Silao km 9, Irapuato, Gto., C.P. 36500.

[gabriela.rodriguez@ugto.mx](mailto:gabriela.rodriguez@ugto.mx).

### RESUMEN:

El presente trabajo se lleva a cabo con el fin de aprovechar la calidad nutricional del suero, dando una alternativa para que no se desperdicie, y deje de ser desechado convirtiéndose en contaminante. Además de su valor nutricional, la adición de probióticos favorece la actividad proteolítica, liberándose más péptidos con actividad funcional al medio. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de probióticos sobre la proteólisis y perfil peptídico, Para esto se elaboró queso tipo Cheddar y se usó el suero para fermentarlo con diferentes mezclas de probióticos, se almacenaron a 4°C y una vez obteniéndose los filtrados de las bebidas (FB), fueron congelados (-20 °C) hasta su análisis de concentración peptídica y porcentaje de proteólisis a los 0, 7, 14 y 21 días. De los resultados obtenidos, la adición de probióticos no aumentó la actividad proteolítica de las bebidas fermentadas ( $p>0.01$ ) respecto a la bebida control que no se fermentó, en cambio se observaron diferencias significativas ( $p<0.01$ ) por efecto del periodo de vida en anaquel y con respecto a la concentración peptídica de los filtrados no se observaron diferencias significativas ( $p>0.01$ ), entre tratamientos ni durante la vida en anaquel..

### ABSTRACT:

The present work is carried out to take advantage of the nutritional quality of the whey, giving an alternative so that it is not wasted, and stops being discarded becoming a contaminant. In addition to its nutritional value, the addition of probiotics favors proteolytic activity, releasing more peptides with functional activity to the medium. The objective of this work was to evaluate the effect of the addition of probiotics on the proteolysis and peptide profile, for this Cheddar type cheese was elaborated and the serum was used to ferment it with different mixtures of probiotics, they were stored at 4°C and once obtained the filtered from the beverages (FB), were frozen (-20 °C) until their analysis of peptide concentration and percentage of proteolysis at 0, 7, 14 and 21 days. Of the results obtained, the addition of probiotics did not increase the proteolytic activity of fermented beverages ( $p>0.01$ ) compared to the control drink that was not fermented, whereas significant differences were observed ( $p<0.01$ ) due to the effect of the life period On shelf and with respect to the peptide concentration of the filtrates, no significant differences were observed ( $p>0.01$ ), between treatments or during shelf life..

### Palabras clave:

Bebida, fermentación, péptidos, proteólisis.

### Key words:

Beverage, fermentation, peptides, proteolysis

### Área:

Lácteos.

## INTRODUCCIÓN

La leche y sus derivados son fuente de diversos nutrientes que además de suministrar energía, contienen proteínas de alta calidad, minerales y vitaminas. Las proteínas de la leche de vaca representan cerca del 3.5 % de sus componentes totales y se dividen en dos grupos: las caseínas y las proteínas del suero (Park, 2009).

El suero de queso es un líquido resultante de la precipitación y separación de las caseínas de la leche durante la elaboración del queso (Prazares et al., 2012). Éste contiene más del 50% de los sólidos de la leche, incluyendo proteínas, lactosa, minerales y vitaminas. Se clasifica de acuerdo con el pH, y según el tipo de queso del cual se separe, puede ser ácido o dulce. El suero dulce es extraído de los procesos de queso como los tipos Cheddar y tienen un pH mayor a 5.6 (Tunick, 2008). Este último retiene cerca del 55 % de los nutrientes de la leche y está compuesto

por: 93 % agua, 5 % lactosa, 0.85 % proteínas, 0.53 % minerales y 0.36 % grasa. Por cada 10 lt de leche, se puede elaborar 1 kg de queso tipo Cheddar, obteniéndose como subproducto aproximadamente 9 lt de suero (Pescuma et al., 2010). En algunos de los casos este subproducto es desechado al drenaje (Miranda et al., 2007). En relación con esto, la norma mexicana NOM-001-ECOL-1996 permite verter en ríos sustancias con una demanda bioquímica de oxígeno (DBO) máxima de 150 mg/lt, ya que no existe regulación para drenaje. Por consiguiente, el suero de leche es considerado un potente contaminante, ya que presenta una DBO de 35 - 50 kg/lt y su mal manejo representa un problema ambiental.

### **Bebidas Fermentadas.**

Una bebida láctea fermentada puede definirse como una mezcla de leche y otros productos lácteos adicionada con cultivos microbianos (Castro et al., 2009). Los probióticos son microorganismos vivos que aportan un beneficio a la salud del consumidor (Nakamura y Omaye, 2012) proporcionándole un balance a la microflora del intestino (Kailasapathy y Chin, 2000). En 1913 Jolles, desarrolló una bebida a base de suero lácteo esterilizada y adicionada con ácidos, sales y medicamentos (Holsinger et al., 1974). Desde entonces las bebidas lácteas formuladas con suero de leche han ido ganando terreno en el mercado global, ya que además de requerir de tecnología simple, han sido bien aceptadas por consumidores de diferentes edades (Silveira et al., 2015). El suplementar el suero con probióticos representa una nueva opción para dar valor agregado a este subproducto de la industria quesera y a las bebidas lácteas (Castro et al., 2013). Existe gran diversidad de bebidas fermentadas a base de suero; usando granos de kéfir como cultivos iniciadores (Teixeira et al., 2011), a base de suero liofilizado rehidratado en agua (Beucler et al., 2005; Pescuma et al., 2010), el suero fermentado con probióticos (Maity et al., 2008), o mezclas de suero y leche (González y González 2002).

### **Proteólisis.**

Aunado a la función nutricional del suero, es sabido que, debido a la naturaleza de sus proteínas, tras su hidrólisis se pueden generar péptidos (Korhonen y Pihlanto, 2006). La proteólisis es la degradación de las proteínas por acción del sistema proteolítico de las bacterias ácido-lácticas (BAL), lo que produce pequeños péptidos y aminoácidos libres (Smit et al., 2005). Durante la fermentación de la leche, el sistema proteolítico de los cultivos iniciadores juega un rol clave (Serra et al., 2009), ya que la proteólisis que lleva a cabo cada microorganismo es iniciada por una sola proteinasa extracelular. Sin embargo, algunas BAL no sintetizan proteinasas extracelulares, dependiendo en este caso de otras cepas que las liberen al medio. La proteólisis en leches fermentadas es entonces de suma importancia por varios aspectos: puede determinar la sobrevivencia de los cultivos iniciadores, contribuye a la formación de compuestos del sabor y olor, confiere propiedades reológicas, así como también permite la formación de péptidos bioactivos (Serra et al., 2009). De los microorganismos que se encuentran frecuentemente formando parte de los cultivos iniciadores, los más estudiados han sido *Lactococcus spp.* y *Lactobacillus spp.* (Ebringer et al., 2008). Se ha reportado que algunas especies como *Lactobacillus spp.* poseen proteinasas que hidrolizan en mayor medida la proteína de leche de cabra (Minervini et al., 2009). El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la adición de diferentes probióticos en las bebidas a base de suero de queso Cheddar, sobre la concentración peptídica y actividad proteolítica, durante su vida en anaquel.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Preparación del queso tipo Cheddar**

Inicialmente se llevó a cabo la elaboración del queso tipo Cheddar, seguido de la preparación de las bebidas fermentadas, para el primer tratamiento con ABT-4R- *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* y *Streptococcus thermophilus*; para el segundo con R-704- *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. cremoris* (Chr Hansen de México S.A de C.V.); y el tercero, un control sin fermentar. Tomándose muestras a los 0, 7, 14 y 21 días, a fin de determinar la concentración peptídica total y el porcentaje de proteólisis.

### **Obtención de los filtrados**

La obtención de los filtrados de las bebidas (FB) se llevó a cabo según lo descrito por Donkor et al. (2007). Se tomaron 2,5ml de cada una de las unidades experimentales y se mezclaron con 5ml de ácido tricloroacético 0,75%.

La mezcla se pasó a través de papel filtro Whatman N° 1 (de 150mm) y los filtrados fueron congelados a -20°C hasta su análisis.

**Determinación de la concentración peptídica total.**

Se determino la concentración de los péptidos contenidos en cada una de las FP por triplicado 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. Donde se realiza la curva de calibración, en el cual se prepararon cinco estándares de Albúmina de Suero Bovino (BSA), según las concentraciones de los péptidos. Dicha técnica se usa para la determinación de proteína total, no obstante, en las FP solamente estuvieron los péptidos filtrados. Todos los estándares se prepararon en solución salina 0.15 M. Para el análisis de las muestras se tomó 0.1 mL de las FP o del estándar, y se mezclaron con 1 mL del reactivo de Bradford, se agitó una vez por inmersión y se dejaron reaccionar en la oscuridad a temperatura ambiente por 5 min, posteriormente se leyó la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro (Genesys 105 UV-VIS Spectrophotometer). La medida de absorbancia obtenida se linealizó en la ecuación de regresión de la curva de calibración y se determinó la concentración peptídica de cada uno de los FP

**Actividad proteolítica.**

La proteólisis de cada uno de los FB se determinó por triplicado con base en la reacción de las aminas primarias (NH3) libres con el O-phthaldialdehido (OPA) y el β-mercaptoetanol, según el método de Church et al. (1983). 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 aforó a 50 mL con agua tridestilada. Para las lecturas se tomó 50 µL de cada FB, 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, se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm. Con lo cual, se determinó el grado de proteólisis por diferencia entre las actividades proteolíticas de la bebida sin fermentar o muestra control como lo realizan Donkor et al., (2007).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Concentración peptídica total**

La concentración peptídica de las muestras oscila entre 0.4±0.02 y 0.52±0.01 mg. l<sup>-1</sup>, durante su vida en anaquel como se muestra en el la Tabla I. Para este análisis se presentaron por efecto los tratamientos (p<0.01), la vida de anaquel (p<0.01) y, por lo tanto, la interacción de ellos (p<0.01). La concentración peptídica en todos los tratamientos incluyéndose el control, no se encontraron diferencias significativas en la concentración peptídica de las bebidas, ni por efecto de los tratamientos y por lo tanto tampoco en el efecto del monitoreo durante la vida de anaquel. En otro estudio realizado por Rodríguez-Hernández y Chávez-Martínez A. (2018), con yogur de leche de cabra adicionado con probióticos, muestran que su concentración peptídica osciló entre 0.05 y 0.06 mg. l<sup>-1</sup>, durante su vida en anaquel. La concentración peptídica, en todos los tratamientos incluyéndose el control, mostró una tendencia a disminuir con el tiempo, sin embargo, el control y uno de los tratamientos con los cultivos utilizados (RR22LY0) presentaron siempre la concentración más alta, además de que el hecho que el control haya presentado la mayor concentración de péptidos pone de manifiesto que el proceso llevado a cabo per se produjeron péptidos, lo que pudo deberse al proceso térmico al que se sometió la leche.

**Tabla I.** Concentración peptídica en filtrados de bebidas lácticas durante vida de anaquel

| Tratamientos | Vida de anaquel (en días) |           |           |           |
|--------------|---------------------------|-----------|-----------|-----------|
|              | 0                         | 7         | 14        | 21        |
| Control      | 0.40±0.02                 | 0.51±0.08 | 0.46±0.37 | 0.51±0.08 |
| ABT4         | 0.48±0.09                 | 0.44±0.04 | 0.40±0.02 | 0.45±0.01 |
| R704         | 0.46±0.10                 | 0.46±0.06 | 0.45±0.01 | 0.52±0.01 |

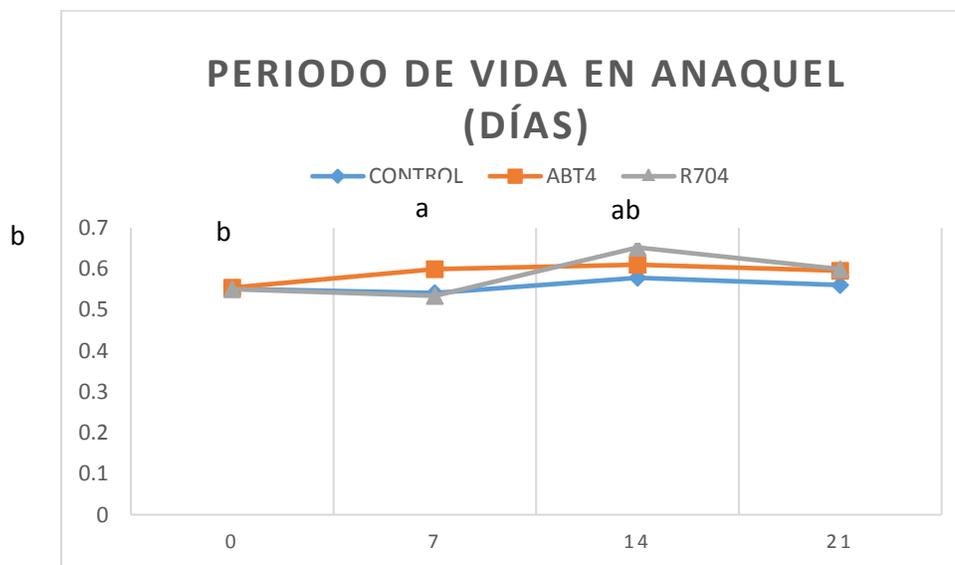
No existieron diferencia significativa entre los tratamientos durante la vida de anaquel (p>0.01).

El hecho de que no hubiese diferencias significativas en los tratamientos pudo haber sido el proceso al que fue sometido los filtrados.

### Actividad proteolítica

La actividad proteolítica de las muestras presentaron diferencias por efecto de los tratamientos ( $p < 0.01$ ) y la vida en anaquel ( $p < 0.01$ ), y, por lo tanto, la interacción entre ellos ( $p < 0.01$ ) como se observa en la Figura 1. En este análisis no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para la actividad proteolítica, no obstante, este sí muestra una diferencia según el día de monitoreo, observándose un incremento al aumentar el periodo de vida en anaquel, también se puede observar que tanto el control como el tratamiento ABT-4 mantuvieron más constante su perfil. En el estudio realizado por Rodríguez-Hernández y Chávez-Martínez (2018), donde la actividad proteolítica de las muestras obtenidas osciló entre 1.66 a 90.94% correspondido a las absorbancias entre 1.01 y 1.65 presentando efecto en los tratamientos empleados ( $p < 0.05$ ) y la vida de anaquel ( $p < 0.05$ ). Donde los tratamientos empleados (RR22L40 y MM101) fueron los que presentaron mayor actividad proteolítica.

**Figura 1.** Actividad proteolítica de las bebidas fermentadas durante su vida de anaquel.



Se observa que el control y el tratamiento ABT-4 se mantienen constantes, respecto con el otro tratamiento el R-704. No existieron diferencias significativas entre tratamientos, ni vida de anaquel. Control: sin probiótico adicional, <sup>ab</sup>literales diferentes en una misma columna indican que no hay diferencias.

Comparando con la actividad proteolítica del control (tomado como 0%, para observar el efecto proteolítico de los probióticos según el tratamiento); no existió diferencia estadística entre ellos. El control presentó la menor actividad proteolítica, siendo ésta estadísticamente diferente a los tres tratamientos. Lo anterior se observó durante toda la vida en anaquel. La adición de probióticos ejerció un incremento ( $p < 0.05$ ) en la actividad proteolítica del yogur. Debe considerarse también que entre los probióticos empleados se generan diferentes asociaciones simbióticas (Ustok et al., 2007); sin embargo, el grado de actividad proteolítica que se detecte es debida en mayor grado a la simbiosis entre los microorganismos presentes, más que al decremento de la cantidad de proteína que se hidroliza (Salminen et al., 2004)

### CONCLUSIÓN

De los resultados obtenidos, la adición de probióticos no aumentó la actividad proteolítica de las bebidas fermentadas respecto a la bebida control que no se fermentó, en cambio se observaron diferencias significativas por efecto del periodo de vida en anaquel y con respecto a la concentración peptídica de los filtrados no se observaron diferencias significativas ni entre tratamientos ni con respecto al control, ni por efecto de la vida en anaquel. En otros estudios, se ha observado que los tratamientos elaborados presentaron mayor actividad proteolítica con respecto a la actividad que presentó el control que es no fermentado, durante el análisis de la vida en anaquel.

## BIBLIOGRAFÍA

- Beucler, J., M. Drake y E. A. Foegeding. 2005. Design of a beverage from whey permeate. *J. Dairy Sci.* 70: S277-S285.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72:248-254.
- Castro, W. F., A. G. Cruz, M. S. Bisinotto, L. M. R. Guerreiro, J. A. F. Faria, H. M. A. Bolini, R. L. Cunha y R. Deliza. 2013. Development of probiotic dairy beverages: Rheological properties and application of mathematical models in sensory evaluation. *J. Dairy Sci.* 96:16–25.
- Castro, W. F., T. M. Cunha, P. J. Ogliari, R. F. Teófilo, M. M. C Ferreira y E. S. Prudencio. 2009. Influence of different content of cheese whey and oligofructose on the properties of fermented lactic beverages: study using response surface methodology. *LWT-Food Sci. Technol.* 42: 993-997.
- Christensen JE, Dudley EG, Pederson JA, Steele JL (1999) Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Ant. van Leeuwenhoek* 76: 217-246.
- Costa, E. L., J. A. Rocha y F. Netto. 2007. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. *Int. Dairy J.* 17:632–640.
- Donkor ON, Nilmini SLI, Stolic P, Vasiljevic T, Shah NP (2007) Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yogurt during cold storage. *Int. Dairy J.* 17: 657-665.
- Drgalic, I., L. Tratnik y R. Bozanic. 2005. Growth and survival of probiotic bacteria in reconstituted whey. *EDP Sci.* 85:171-179.
- Ebringer L, Ferencik M, Krajcovi J (2008) Beneficial health effects of milk and fermented dairy products - Review. *Folia Microbiol.* 53: 378-394
- González, H. X. R. y R. J. R. González. 2002. Utilización del suero de leche para la elaboración de una bebida fermentada. Tesis de Licenciatura. Universidad EARTH. Guácimo, Costa Rica
- Gobbetti M, Stepaniak L, De Angelis M, Corsetti A, Di Cagno R (2002) Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr* 42: 223-239
- Holsinger, V. H., L. P. Posati y E. D. Devilbiss. 1974. Whey beverages. *J. Dairy Sci.* 57: 849-859
- Kailasapahty, K. y J. Chin. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunol. Cell Biol.* 78:80-88.
- Korhonen, H. y A. Pihlanto. 2006. Bioactive peptides: production and functionality. *Int. Dairy J.* 16: 945-960.
- Maity, T. K., R. Kumar y A. K. Misra. 2008. Development of healthy whey drink with *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum* and *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. *Mljekarstvo* 58:315-325
- Minervini F, Bilancia MT, Siragusa S, Gobbetti M, Caponio F (2009) Fermented goats' milk produced with selected multiple starters as a potentially functional food. *Food Microbiol.* 26: 559-564.
- Miranda, M. O., P. L. Fonseca, I. Ponce, C. Cedeño, L. S. Rivero y L. M. Vázquez. 2007. Elaboración de una bebida fermentada a partir del suero de queso. Características distintivas y control de calidad. *Rev. Cub. Alim. Nutrit.* 17:103-108
- Nakamura, Y. K. y S. T. Omaye. 2012. Metabolic diseases and pro- and prebiotics: mechanistic insights. *Nutr. Metab.* 9:1-9.
- Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, que establece los límites máximos permisibles en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial de la Federación. Enero de 1996.
- Park, Y. W. 2009. Bioactive components in milk and dairy. Products. Athenas Georgia, USA: *Wiley-Blackwell.* 396 pp.
- Prazares, A. R., F. Carvalho y J. Rivas. 2012. Cheese whey management: A review. *J. Environ. Manage.* 110 :48-68.
- Pescuma, M., E. M. Hébert, F. Mozzi y G. Font de Valdez. 2010. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 141 :73–81.
- Rodríguez-Hernández G, Chávez-Martínez A. (2018). Actividad proteolítica y concentración peptídica en yogur de leche de cabra adicionado con probióticos. *Interciencia.* 43:(1) 50–54.
- Serra M., Trujillo A.J, Guamis B, Ferragut V (2009) Proteolysis of yogurts made from ultra-highpressure homogenized milk during cold storage. *J. Dairy Sci.* 92: 71-78.

- Silveira, E. O., J. H. Lopes- Neto, L. A. Silva, A. E.S. Raposo, M. Magnani y H. R. Cardarelli. 2015. The effects of inulin combined with oligofructose and goat cheese whey on the physicochemical properties and sensory acceptance of a probiotic chocolate goat dairy beverage. *LWT-Food Sci. Technol.* 62:445–451.
- Smit G, Smit BA, Engels WJ (2005) Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 591-560.
- Tunick, M.H. 2008. Whey protein production and utilization. En *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*. Onwulata, C. y P. Huth. Editorial: *Blackwell publishing*. USA